*Postverlagsort Berlin*

# PLANTA

## ARCHIV FÜR WISSENSCHAFTLICHE BOTANIK

UNTER MITWIRKUNG VON

**J. BONNER**-PASADENA, **A. ERNST**-ZÜRICH, **H. v. GUTTENBERG**-ROSTOCK
**R. HARDER**-GÖTTINGEN, **O. RENNER**-MÜNCHEN, **W. SCHUMACHER**-BONN

HERAUSGEGEBEN VON

**W. RUHLAND** UNTERDEUFSTETTEN **L. BRAUNER** MÜNCHEN **E. BÜNNING** TÜBINGEN

50. BAND, 4. HEFT

MIT 55 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 21. DEZEMBER 1957)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1958

Planta (Berl.)

*Preis DM 25.80*

# Planta. Archiv für wissenschaftliche Botanik

Begründet 1925. Band 1—34 (1945) herausgegeben von *W. Ruhland* und *H. Winkler*. (Band 1—21, 1934, als „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie", Abteilung E). Band 35—47. Herausgegeben von *W. Ruhland* und *O. Renner*.


Die Zeitschrift „Planta", Archiv für wissenschaftliche Botanik, steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden sobald wie möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung raschester Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 40.— für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophotographien u. ä. von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an

*Professor Dr. Wilhelm Ruhland*, (14a) *Unterdeufstetten über Crailsheim*, oder an

*Professor Dr. Leo Brauner, München 19, Menzingerstr. 67, Botanisches Institut der Universität*, oder an

*Professor Dr. E. Bünning, Tübingen, Botanisches Institut der Universität, Wilhelm-Straße 5.*


**Springer-Verlag**

Berlin W 35, Reichpietschufer 20, Fernsprecher 249251
und
Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 28—30, Fernsprecher 27901


50. Band **Inhaltsverzeichnis** 4. Heft


Stein von Kamienski, E., Untersuchungen über die flüchtigen Amine der Pflanzen. III. Mitteilung. Die Amine von Pilzen. Über den Weg der Aminbildung in Pflanzen. Mit 8 Textabbildungen . . . . . 331

Schwarze, P., und N. O. Frandsen, Beobachtungen über den Tryptophanabbau durch Pilze. Mit 3 Textabbildungen . . . . . 353

Lyr, H., Über den Nachweis von Oxydasen und Peroxydasen bei höheren Pilzen und die Bedeutung dieser Enzyme für die Bavendamm-Reaktion. Mit 5 Textabbildungen . . . . . 359

Krüpe, M., und A. Ensgraber, Untersuchungen über die Natur der „Phytagglutinine" in chemischer, immunochemischer und pflanzenphysiologischer Sicht. I. Mitteilung. Anatomische Studien über den Ort ihres Vorkommens in höheren Samenpflanzen . . . . . 371

Wild, A., Experimentelle Beeinflussung des Granamusters einer abweichenden Plastidensorte von Antirrhinum majus. Mit 10 Textabbildungen. . . . . 379

Schlafke, E., Kritische Untersuchungen zur Wanderung von Fluorochromen in Blättern. Mit 15 Textabbildungen . . . . . 388

Steffen, K., und W. Landmann, Entwicklungsgeschichtliche und cytologische Untersuchungen am Balkentapetum von Gentiana cruciata L. und Impatiens glandulifera Royle. Mit 14 Textabbildungen . . . . . 423



Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutzgesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Planta, Bd. 50, S. 331—352 (1958)

Aus dem Pharmakognostischen Institut der Universität Bonn

# UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE FLÜCHTIGEN AMINE DER PFLANZEN*

III. Mitteilung

## DIE AMINE VON PILZEN. ÜBER DEN WEG DER AMINBILDUNG IN PFLANZEN

Von

ELARD STEIN VON KAMIENSKI

Mit 8 Textabbildungen

*(Eingegangen am 10. August 1957)*

## A. Einleitung, Methodik

Mit Ausnahme von *Claviceps purpurea*, worüber aber in einem gesonderten Kapitel gesprochen wird (s. S. 340), sind die Pilze nur sehr wenig auf das Vorkommen von Aminen untersucht worden. C. REUTER (1913) fand i-Amylamin in *Boletus edulis*. Dieser Autor führt auch einige weitere Arbeiten an. So fanden nach seinen Angaben KUSSMAUL und BORNTRÄGER (1912) Trimethylamin in *Amanita muscaria* und WALZ (1854) die gleiche Base in *Tilletia tritici*, die dieser aber für Propylamin hielt. Daneben wiesen W. F. HANNA, H. B. VICKERY und G. W. PUCHER (1932) Trimethylamin in *Tilletia levis* nach. G. KLEIN und M. STEINER (1928) bringen Angaben über Amine von *Phallus impudicus*.

In vielen Pilzbestimmungsbüchern, wie z. B. bei H. JAHN (1949), findet man Hinweise auf Amine als mögliche Duftstoffe von Pilzen, z. B. bei *Russula xerampelina:* „Riecht nach Trimethylamin". Unseres Wissens sind diese Angaben bisher chemisch nicht belegt.

Wegen der verwendeten Aufarbeitungs- und Untersuchungsmethoden sei auf die früheren Mitteilungen des Verfassers verwiesen (E. STEIN v. KAMIENSKI 1957 a, b).

## B. Fruchtkörper höherer Pilze

Die Pilze stammten zum großen Teil aus der Umgebung von Bonn und Bad Godesberg, insbesondere aus dem Kottenforst. Einiges Material wurde im Eggegebirge (Reelsen bei Bad Driburg i. Westf.) und bei Hedemünden (bei Hann.-Münden) gesammelt. Eine Probe von *Anthurus muellerianus* kam aus Heidelberg. In den letzteren Fällen wurden die Fruchtkörper in schwach salzsäurehaltigem Äthanol konserviert[1].

* Teil einer Dissertation der Math.-naturw. Fakultät der Universität Bonn (D 5) in gekürzter Druckfassung.

[1] Als Bestimmungsbücher für die Pilze wurden verwendet: H. JAHN: „Pilze rundum" (1949). H. GAMS: „Kleine Kryptogamenflora von Mitteleuropa, Band 2" (1953). Für Beschaffung und Bestimmung mehrerer Pilze bin ich Herrn Dr. H. BUTIN (Hann.-Münden) zu Dank verpflichtet. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. W. RAUH (Heidelberg) für die Überlassung einer *Anthurus*-Probe.

Von manchen Arten wurden mehrere Proben verschiedener Entwicklungsstadien, von verschiedenen Standorten und Jahreszeiten untersucht. Die Zahl der untersuchten Proben ist dann in Klammern angegeben. Arten, bei denen *keine* Amine gefunden wurden, sind durch ° gekennzeichnet. Wegen der aminführenden Arten vgl. die Übersicht S. 333ff., wegen des in Spuren weit verbreiteten Methylamins vgl. S. 333.

### *I. Untersuchte Arten*

**Ascomycetes.**

**Pezizaceae.** °*Peziza aurantia.*

**Basidiomycetes.**

**Tremellaceae.** °*Tremellodon gelatinosus.*

**Sclerodermataceae.** °*Scleroderma vulgare.*

**Lycoperdaceae.** *Lycoperdon gemmatum, L. piriforme.*

**Phallaceae.** °*Phallus impudicus* (11), *Mutinus caninus* (3).

**Clathraceae.** *Anthurus muellerianus var. aseroeformis* (2), *Clathrus ruber* (3).

**Clavariaceae.** °*Clavaria pistillaris,* °*C. (Ramaria) abietina,* °*C. aurea.*

**Telephoraceae.** °*Telephora palmata.*

**Cantharellaceae.** °*Cantharellus cibarius.*

**Hydnaceae.** °*Dryodon cirrhatus.*

**Boletaceae.** °*Xerocomus badius* (2), *X. sanguineus, X. subtomentosus,* °*X. chrysenteron,* °*Ixocomus elegans,* °*I. luteus, Trachypus versipellis* (2), *T. scaber,* °*Gyrodon lividus, Boletus luridus* (2), *B. edulis* (3), *B. regius, B. appendiculatus, B. queletii* (2).

**Russulaceae.** *Lactarius deliciosus* (2), *L. vellereus,* °*L. rufus* (2), *L. helvus,* °*L. mitissimus,* °*L. flexuosus, Russula foetens* (2), °*R. integra* (2), °*R. fragilis, R. aurata,* °*R. decolorans* (2), °*R. adusta* (2), *R. turci, R. xerampelina var. barlae* (2), *R. xerampelina var. rubra, R. sardonia* (3), *R. lepida* (6), *R. cyanoxantha* (5), *R. grisea, R. olivacea* (2), °*R. violacea,* °*R. paludosa,* °*R. emetica* (2), *R. violeipes* (2), °*R. liliacea, R. azurea, R. delica* (2), *R. pseudodelica,* °*R. sanguinea* (2), *R. ochroleuca* (2), °*R. solaris, R. vesca,* °*R. nauseosa,* °*R. virescens,* °*R. albonigra, R. alutacea,* °*R. mustelina, R. maculata,* °*R. atropurpurea, R. nigricans,* °*R. intactior.*

**Hygrophoraceae.** °*Hygrophorus (Limacium) agathosmus.*

**Tricholomataceae.** °*Tricholoma album,* °*T. sulphureum,* °*T. saponaceum,* °*T. nudum, T. terreum,* °*T. gambosum, Marasmius peronatus,* °*M. oreades,* °*Mycena pura,* °*Laccaria laccata,* °*Clitocybe inversa* (2) ,°*C. fragrans,* °*C. fuligineipes,* °*C. infundibuliformis,* °*Collybia maculata.*

**Amanitaceae.** °*Amanita muscaria,* °*A. rubescens* (2), °*A. spissa* (2), °*A. mappa, A. phalloides* (2), °*A. junquillea,* °*Amanitopsis vaginata* (2).

**Agaricaceae.** *Lepiota clypeolaria,* °*Psalliota arvensis,* °*P. silvatica.*

**Cortinariaceae.** °*Hebeloma crustuliniforme*, °*H. sinapizans*, *Dermocybe (Cortinarius) cinnamomea*, °*D. (Hydrocybe) incisa*, *Phlegmacium (Cortinarius) mellioleus*.

**Strophariaceae.** *Pholiota mutabilis*, *Nematoloma fasciculare*.

### *II. Verbreitung der einzelnen Amine*

Es wurden 105 Arten aus 18 Familien auf Amine geprüft. In 44 Arten wurden Amine mit Sicherheit festgestellt. Im einzelnen wurden gefunden:

| | | | |
|---|---|---|---|
| *Methylamin* | (Meth.) | in 22 Arten | (s. S. 333) |
| *Dimethylamin* | (Dim.) | in 10 Arten | (s. S. 333) |
| *Trimethylamin* | (Trim.) | in 8 Arten | (s. S. 334) |
| *i-Amylamin* | (i-Am.) | in 19 Arten | (s. S. 334) |
| *β-Phenylaethylamin* | (Ph. Aeth.) | in 4 Arten | (s. S. 335) |

*Ammoniak* ist in Pilzfruchtkörpern stets vorhanden und zwar in weit größeren Mengen als bei Blütenpflanzen. 80—100 $\gamma$/g Frischgewicht (Frg.) sind die Regel. Der $NH_3$-Gehalt steigt im allgemeinen mit zunehmendem Alter an.

*a) Methylamin.* Es sind, wie bei den Blütenpflanzen, nur diejenigen Arten angeführt, deren Methylamingehalt über etwa 5 $\gamma$/10 g Frg. liegt.

*Scleroderma vulgare*
*Anthurus muellerianus*
*Mutinus caninus* (i-Am.)
*Trachypus versipellis* (i-Am.)
*Boletus edulis* (i-Am.)
*Boletus appendiculatus*
*Lactarius deliciosus*
*Lactarius vellereus*
*Lactarius helvus*
*Russula foetens* (i-Am.)
*Russula turci* (Dim.)
*Russula sardonia* (Dim.)
*Russula lepida* (Dim., Trim.)
*Russula violeipes* (Trim.)
*Russula azurea*
*Russula delica*
*Russula ochroleuca*
*Russula vesca* (Dim.)
*Russula alutacea* (Dim.)
*Russula maculata* (i-Am.)
*Dermocybe (Cortinarius) cinnamomea*
*Lepiota clypeolaria*
*Pholiota mutabilis* (Ph. Aeth.)

Methylamin tritt also auch in Pilzfruchtkörpern in größeren Mengen recht oft zusammen mit anderen Aminen auf, ist aber in Spuren auch in sonst aminfreien Pilzen weit, vielleicht sogar allgemein verbreitet. Irgendeine „Bevorzugung" bestimmter Begleitamine ließ sich nicht feststellen.

*b) Dimethylamin*

*Clathrus ruber* (Trim.)
*Russula aurata*
*Russula sardonia*
*Russula turci* (Meth., i-Am.)
*Russula lepida* (Meth.)
*Russula cyanoxantha*
*Russula grisea*
*Russula olivacea*
*Russula vesca* (Meth.)
*Russula alutacea* (Trim., Meth.)

Dimethylamin ist vor allem in der Gattung *Russula* weit verbreitet. Es wurde in rund $^1/_4$ der geprüften Arten (9 unter 35) gefunden. Ein

später mitgeteilter Versuch (s. S. 337) zeigt, daß es auch in autolysierenden Fruchtkörpern von *Russula foetens* gebildet wird, die im frischen Zustand keine nachweisbaren Dimethylaminmengen enthalten. Daß es nicht nur in alternden Fruchtkörpern gebildet wird, ergab eine Untersuchung ganz junger Fruchtkörper von *Russula lepida* (Reelsen, 19. 9. 54), welche neben $NH_3$ nur Dimethylamin (20 $\gamma$/g Frg.) enthielten. Bei der Autolyse von *Boletus*- und *Psalliota*-Arten (s. S. 336f.) treten zwar verschiedene andere Amine, aber kein Dimethylamin auf. Seine Bildung scheint also für die Gattung *Russula* irgendwie spezifisch zu sein. In diesem Zusammenhang sei eine Beobachtung erwähnt, die bei zwei *Russula*-Arten gemacht wurde, von denen je eine Probe aus der Bonner Umgebung und von Reelsen zur Untersuchung kam:

*Russula olivacea*, Kottenforst b. Bonn 14. 8. 53: $NH_3$
*Russula olivacea*, Reelsen 20. 8. 54: $NH_3$, Dim.
*Russula violeipes*, Reelsen 20. 8. 54: $NH_3$, Meth., Dim., Trim.
*Russula violeipes*, Kottenforst b. Bonn 24. 9. 54: $NH_3$, Meth., Trim.

In beiden Fällen enthielt also nur das Reelsener Material Dimethylamin. Das mag ein Zufall sein. Vielleicht spielt aber auch der Standort bei Reelsen (Buchenwald auf Kalkunterlage) eine Rolle.

In dem Aaspilz, *Clathrus ruber*, findet sich Dimethylamin ebenso wie in den Blüten von *Heracleum sphondylium* (E. STEIN v. KAMIENSKI 1957 b) und in der Flechte *Sticta sylvatica* (s. u. S. 340) zusammen mit Methylamin und Trimethylamin.

*c) Trimethylamin*

*Clathrus ruber* (Dim., Meth.)
*Xerocomus subtomentosus* (i-Am.)
*Russula xerampelina var. barlae*
*Russula xerampelina var. rubra*
*Russula lepida* (Dim.)
*Russula violeipes*
*Russula pseudodelica*
*Russula alutacea* (Dim., Meth.)
*Russula nigricans*

Trimethylamin ist also bei Pilzen anscheinend nicht sehr weit verbreitet. Die *Russula*-Arten, in denen es gefunden wurde, sind zumeist durch einen deutlichen Heringsgeruch ausgezeichnet.

*d) i-Amylamin*

*Lycoperdon gemmatum*
*Lycoperdon piriforme*
*Mutinus caninus* (Meth.)
*Xerocomus sanguineus*
*Xerocomus subtomentosus* (Trim.)
*Trachypus scaber*
*Boletus luridus*
*Boletus edulis* (Meth.)
*Boletus regius*
*Boletus appendiculatus* (Meth.)
*Boletus queletii*
*Russula foetens* (Meth.)
*Russula turci* (Meth., Dim.)
*Russula maculata* (Meth.)
*Marasmium peronatus* (Ph. Aeth.)
*Tricholoma terreum* (?)
*Amanita phalloides*
*Phlegmacium mellioleus* (Ph. Aeth.)
*Nematoloma fasciculare* (Ph. Aeth.)

i-Butylamin konnte in frischen Pilzfruchtkörpern bisher niemals gefunden werden; vgl. aber das Auftreten bei der Autolyse (S. 336 f.); dagegen i-Amylamin relativ häufig. Wie bei den Blütenpflanzen ist es, abgesehen vom Methylamin, das am häufigsten vorkommende Amin. Besonders oft tritt es bei denjenigen Arten der Boletaceen auf, die ein an der Luft blauendes Fleisch besitzen und durch einen stechenden Geruch ausgezeichnet sind. Dieser tritt in ähnlicher Art übrigens auch bei den i-Amylamin-positiven *Lycoperdon*-Arten auf. Unter den untersuchten *Amanita*-Arten führt nur der sehr giftige grüne Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*) i-Amylamin; auch dieser Pilz fällt durch einen eigenartigen Geruch auf. In der Gattung *Russula* tritt i-Amylamin sporadisch auf. Bei *Russula foetens* wurde es in beiden untersuchten Proben (Kottenforst 24. 9. 53 und 27. 8. 54) angetroffen.

*e) β-Phenylaethylamin*

*Marasmius peronatus* (i-Am.) — *Nematoloma fasciculare* (i-Am.)
*Phlegmacium mellioleus* (i-Am.) — *Pholiota mutabilis* (Meth.)

Dieses Amin ist bei den Pilzen offenbar nicht sehr verbreitet. Auffallend ist, daß es, wie bei vielen Blütenpflanzen, auch hier in der Regel vergesellschaftet mit i-Amylamin vorkommt. Die Mengen beider Amine sind bei den Pilzen aber etwa gleich.

*f) Aethanolamin (Hinweis).* In einigen Pilzen wurde noch eine Ninhydrin-positive Substanz gefunden, die sich papierchromatographisch wie Aethanolamin verhielt. Der Nachweis konnte aber nicht mit Sicherheit geführt werden, da Aethanolamin mit Dinitro-α-Naphthol im Hängetropfen keine Reaktion gibt (Stein v. Kamienski 1957 a) und andere Identifizierungsverfahren von uns nicht studiert wurden.

Diese Substanz wurde gefunden in: *Boletus (Trachypus) versipellis, Boletus edulis, Xerocomus badius, Lepiota clypeolaria, Pholiota mutabilis, Tricholoma nudum, Russula maculata, Russula turci, Lactarius vellereus, Amanita muscaria.*

Überall wurde die Substanz bei der Analyse des Destillats nur in Spuren gefunden. Das würde zur geringen Flüchtigkeit des Aethanolamins mit Wasserdampf (s. E. Stein v. Kamienski, 1957 a) gut passen.

Als Baustein der Phosphatide vom Kephalintypus ist Aethanolamin im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet. In freier Form wurde es u. W. bisher weder bei höheren Pflanzen noch bei Pilzen mit Sicherheit nachgewiesen. Es dürfte sich lohnen, die hier gegebenen Hinweise weiter zu verfolgen.

### *III. Amine bei der Autolyse von Pilzfruchtkörpern*

C. Reuter (1913) untersuchte in seiner Arbeit über stickstoffhaltige Bestandteile von *Boletus edulis* auch die Autolyseprodukte dieses Pilzes. Er wies mit Hilfe von $PtCl_4$ im frischen Pilz i-Amylamin und im durch

Chloroform steril gemachten Autolysat dazu noch β-Phenylaethylamin, Cadaverin und Putrescin nach und schließt weitere Basen nicht aus.

Auch bei unseren eigenen, im vorausgehenden Abschnitt zusammengefaßten Untersuchungen fanden sich mancherlei Hinweise dafür, daß in überalterten Pilzfruchtkörpern die Anzahl und die Menge der Amine zunimmt. Es wurde daher versucht, über das Auftreten von Aminen bei der Autolyse von Pilzfruchtkörpern etwas in Erfahrung zu bringen.

Tabelle 1. *Boletus edulis (Kottenforst, 15. 11. 53), frische Fruchtkörper, unsterile Autolyse*

| Amine (γ/ml) | Tage | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 10 | 20 | 30 | 60 | 70 | 80 |
| Methyl- . . . . | 10 | 60 | 60 | 150 | 250 | 300 | 10 |
| Trimethyl- . . | — | 130 | 300 | 170 | 500 | 300 | 50 |
| Aethyl- . . . . | — | 80 | 60 | 80 | 30 | 10 | — |
| i-Butyl- . . . | — | 60 | 60 | 230 | 10 | 10 | — |
| i-Amyl- . . . . | 60 | 300 | 500 | 1300 | 250 | 300 | 150 |
| β-Phenylaethyl- | — | 80 | 300 | 300 | 80 | 80 | 20 |
| unbekannt . . | — | 60 | 250 | 250 | 30 | 30 | 20 |
| $NH_3$ . . . . . | n. b. | n. b. | n. b. | n. b. | n. b. | n. b. | n. b. |

Tabelle 2. *Lactarius deliciosus (Kottenforst, 15. 11. 53), frische Fruchtkörper ohne Maden, unsterile Autolyse*

| Amine (γ/ml) | Tage | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 0 | 10 | 20 | 50 |
| $NH_3$ . . . . . | 3 | 15 | 25 | 30 |
| Amine . . . . | keine | | | |

Tabelle 3. *Psalliota campestris (Bad Godesberg, 23. 1. 54), Pilze aus Kultur*

| Amine (γ/ml) | Autolyse | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | unsteril | | | steril | | |
| | Tage | | | Tage | | |
| | 0 | 8 | 18 | 0 | 8 | 18 |
| Methyl- . . . | — | 250 | 50 | — | 150 | 80 |
| Trimethyl- . . | — | 120 | 500 | — | — | — |
| $NH_3$ . . . . . | 3 | 10 | 15 | 3 | 4 | 8 |

Die Pilze wurden frisch im Starmix unter Zugabe von etwas Wasser gründlich zerkleinert. Der erhaltene Organbrei wurde im 500 ml-Erlenmeyer-Kolben stehen gelassen. Nach bestimmten Zeitabschnitten wurden 8 ml des Ansatzes entnommen und in bekannter Weise auf flüchtige Amine analysiert. Die Ergebnisse sind auf 1 ml Gewebebrei umgerechnet; es sind in der Regel Mittelwerte mehrerer Bestimmungen. In einer Anzahl von Fällen wurde der Gewebebrei geteilt; die eine Hälfte wurde

Tabelle 4. *Boletus queletii und Russula foetens*

| Amine (γ/ml) | Autolyse | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | unsteril | | | | steril | | | |
| | Tage | | | | Tage | | | |
| | 0 | 20 | 38 | 58 | 0 | 20 | 38 | 58 |
| *Boletus queletii* (Reelsen, 20. 8. 54) | | | | | | | | |
| Methyl- | 10 | 10 | 10 | 120 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Trimethyl- | — | — | 150 | 250 | — | — | — | — |
| Aethyl- | — | 20 | 20 | 10 | — | — | 20 | 30 |
| i-Butyl- | — | 4 | 4 | 10 | — | — | 10 | 10 |
| i-Amyl- | 20 | 300 | 300 | 620 | 20 | 250 | 300 | 250 |
| ß-Phenyl- | — | 70 | 150 | 50 | — | — | 70 | 10 |
| unbekannt | — | — | 70 | 70 | — | — | — | 10 |
| $NH_3$ | 5 | 10 | 15 | 20 | 5 | 5 | 10 | 15 |
| *Russula foetens* (Kottenforst, 20. 8. 54) | | | | | | | | |
| Methyl- | 10 | 20 | 150 | 120 | 10 | 10 | 10 | 120 |
| Dimethyl- | — | 200 | 70 | 10 | — | — | — | — |
| Trimethyl- | — | 250 | 60 | — | — | — | — | — |
| Aethyl- | — | — | 20 | 20 | — | — | 50 | 120 |
| i-Butyl- | — | — | 20 | — | — | — | — | — |
| i-Amyl- | 20 | 500 | 150 | 50 | 20 | 120 | 200 | 200 |
| ß-Phenyl- | — | — | 10 | — | — | — | — | — |
| $NH_3$ | 5 | 10 | 15 | 30 | 5 | 5 | 10 | 10 |

unsteril, ohne Zusatz, die andere Hälfte steril, unter Zusatz eines Überschusses von Chloroform + Thymol der Autolyse überlassen. Einige Ergebnisse solcher Versuche sind in Tabelle 1—4 wiedergegeben.

Die Resultate lassen sich unter folgenden Gesichtspunkten zusammenfassen:

1. Bei Autolyse- und Fäulnisversuchen mit Pilzfruchtkörpern kann eine Vielzahl von Aminen erhalten werden. Tatsächlich wurden hier mit Ausnahme des n-Hexylamins und der beiden Propylamine alle flüchtigen Amine angetroffen, welche bisher überhaupt in Pflanzen vorgefunden wurden.

2. Die Art der bei verschiedenen Pilzen auftretenden Amine scheint spezifisch zu sein. Besonders zahlreiche Amine entstehen bei *Boletus*-Arten, nur wenige bei *Psalliota*, gar keine bei *Lactarius deliciosus*. Hierbei ist hervorzuheben, daß auch bei letzterer Art eine deutliche Autolyse (bzw. Fäulnis) eingetreten war; der Organbrei wurde im Laufe der Zeit ganz dünnflüssig.

3. Die Unterschiede zwischen den sterilen (Autolyse-) und den unsterilen (Fäulnis-) Versuchen sind vorwiegend quantitativer Natur. Im ersteren Fall treten die Amine langsamer und in geringerer Menge auf als im letzteren. Trimethylamin und Dimethylamin wurde ausschließlich in unsterilen Ansätzen gefunden.

4. In der Reihenfolge des Auftretens der Amine scheint eine gewisse Gesetzmäßigkeit zu herrschen. In der Regel tritt zuerst i-Amylamin auf, welches später quantitativ überwiegt. Etwas Ähnliches wurde übrigens häufig bei Aminbildung im Laufe der Blütenentwicklung festgestellt (s. E. STEIN v. KAMIENSKI, 1957 b).

Alle diese Tatsachen sprechen dafür, daß die Aminbildung in diesen Versuchen wohl in der Hauptsache als das Werk spezifischer *pilzeigener* Fermente gedeutet werden muß. Wenn die Amine nach üblicher Auffassung durch Dekarboxylierung von Aminosäuren gebildet werden und man die naheliegende Annahme macht, daß wohl in allen Pilzen die gleichen Aminosäuren, wenn auch in verschiedener quantitativer Verteilung, vorhanden sind, dann wäre nicht einzusehen, weshalb nicht bei bakterieller Fäulnis *überall* die gleichen, den verbreitetsten Aminosäuren entsprechenden Amine (i-Amyl-, i-Butyl-, Aethyl-, Methylamin) entstehen sollten. Gerade das ist aber offenbar *nicht* der Fall. Die Deutung der qualitativen und quantitativen Unterschiede zwischen sterilen und unsterilen Parallelansätzen muß zunächst offen bleiben. Man könnte aber durchaus an eine Fermenthemmung durch die zugesetzten Antiseptica denken.

Am ehesten muß eine *Bakterienwirkung* bei der Entstehung von Di- und Trimethylamin in Betracht gezogen werden, die bisher nur in unsterilen Ansätzen gefunden wurde (Tabelle 1 und 3). Es muß in diesem Zusammenhang daran erinnert werden, daß sich in den Versuchen von B. T. CROMWELL (1950) mit *Chenopodium vulvaria* das Ferment der Trimethylabspaltung aus Cholin als überaus empfindlich erwies. Es gelang diesem Verf. nicht, aktive Reinpräparate herzustellen.

Schließlich soll auf die ganz unzweifelhafte Abnahme der Amine hingewiesen werden, die in länger dauernden Versuchen beobachtet werden konnte. Da sich diese Erscheinung in größerem Ausmaße nur in den unsterilen Ansätzen fand, wird man hier zunächst an einen Verbrauch durch Bakterien zu denken haben.

Es ist nach den vorstehenden Ergebnissen wahrscheinlich, daß Pilzfruchtkörper ein recht geeignetes Material für das Studium der Biochemie und der Enzymatik der Aminbildung in Pflanzen abgeben dürften.

### *IV. Ein unbekanntes Amin in Pilzautolysaten*

Bereits in den Tabellen 1 und 4 ist kurz vermerkt, daß bei der Autolyse der Fruchtkörper von *Boletus edulis*, *B. queletii* und *Russula foetens* ein „unbekanntes Amin" auftritt.

Im Chromatogramm auf Na-acetat-Papier erscheint mit dem Laufmittel n-Butanol/Wasser/Eisessig (50/49/1) ein Fleck mit einem $R_f$-Wert von 47, also etwas oberhalb der Stelle, die von n- und i-Propylamin eingenommen wird. Mit Ninhydrin entsteht eine ähnliche Rotfärbung

wie bei primären Aminen. Im Collidin/Wasser-Chromatogramm ist die Substanz nicht nachweisbar. Es dürfte sich also um *kein* cyclisches Amin handeln.

Mit Dinitro-α-naphthol (DNN) bilden sich zwei deutlich verschiedene Krystallformen:

1. dicke Platten mit starkem Dichroismus, die der i-Propylamin-Verbindung ähneln (Abb. 1);

2. kurze, wenig charakteristische braune Nadeln, die etwas an die $NH_3$-Verbindung erinnern.

Abb. 1. Unbekannte Substanz aus Pilz-Autolysaten, DNN-Verbindung

Abb. 2. Wie Abb. 1, sublimiert

Beide Krystallformen sublimieren — unter Zersetzung? — um 100°. Auf dem Deckglas erscheinen zunächst farblose Tropfen, aus denen sich schließlich Nadeln bilden, die ihrer Form nach an das Dinitro-α-Naphthol-Reagens erinnern (Abb. 2). Sie schmelzen aber bei 135—136°, also um etwa 10° höher als dieses.

Auch die Trinitro-m-Kresolverbindung spricht dafür, daß es sich wahrscheinlich um ein Gemisch von zwei Substanzen handelt. Der Schmelzpunkt ist sehr unscharf: 125—135°. Ebenso schmilzt das „Eutekticum" mit Benzanilid sehr unscharf zwischen 114 und 124°.

In mancher Hinsicht zeigt die in Rede stehende Substanz recht ähnliche Eigenschaften, wie das in *Secale cornutum* vorgefundene Gemisch von n- und i-Propylamin. Es ist möglich, daß eine Komponente auch hier i-Propylamin ist. Für eine endgültige Klärung sind weitere Untersuchungen notwendig.

### C. Brandpilze

Wie schon in der Einleitung (S. 331) erwähnt wurde, wird für die Brandsporen des Weizenstinkbrandes *(Tilletia tritici)* von mehreren früheren Untersuchern *Trimethylamin* angegeben. Es schien uns von

Interesse, mit unserer Methode zu untersuchen, ob dieses das einzige Amin der Stinkbrandsporen ist.

Befallene Weizenähren wurden uns in dankenswerter Weise vom Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn zur Verfügung gestellt. Es wurde Material untersucht, das frisch vom Versuchsfeld kam, und älteres, das bereits 1 Jahr gelagert war. In beiden Fällen wurden etwa *400 bis 500 γ Trimethylamin* je Ähre gefunden. Andere Amine waren nicht nachweisbar.

### D. Flechten

Von *Sticta sylvatica* und *St. fuliginosa* ist aus den lichenologischen Handbüchern bekannt, daß die im trockenen Zustand fast geruchlosen Thalli beim Befeuchten stark nach „Urin" oder nach „Heringslake" riechen. Unsere Untersuchung ergab folgendes:

*Sticta fuliginosa* Dicks. 10. 8. 54 Material aus Umhausen (Oetztal, Tirol), frisch gesammelt. $NH_3$, Methylamin 12 γ/g Frg., Trimethylamin 750 γ/g Frg.

25. 3. 55 gleiche Probe wie oben, 8 Monate trocken gelagert. $NH_3$, Methylamin 15 γ/g Frg., Trimethylamin 750 γ/g Frg.

*Sticta sylvatica* Hds. 3. 9. 53 Herbarmaterial (Tirol, ohne nähere Angabe). $NH_3$, Methylamin 900 γ/g Frg., Dimethylamin 550 γ/g Frg., Trimethylamin 750 γ/g Frg.

10. 8. 54 Material aus Umhausen (Oetztal, Tirol) frisch gesammelt. $NH_3$, Methylamin 55 γ/g Frg., Trimethylamin 1250 γ/g Frg.

23. 3. 54 gleiches Material wie im vorigen Versuch, 8 Monate trocken gelagert. $NH_3$, Methylamin 55 γ/g Frg., Trimethylamin 1300 γ/g Frg.

In allen Fällen war also Methyl- und Trimethylamin, in einem Fall bei *Sticta sylvatica* auch Dimethylamin nachweisbar. Das sind u. W. die ersten präzisen Angaben über Aminvorkommen bei Flechten.

### E. Mutterkorn

#### *I. Schrifttum*

Das Sclerotium von *Claviceps purpurea* dürfte, abgesehen von der Bierhefe, wohl derjenige Pilz sein, dessen chemische Bestandteile am eingehendsten untersucht worden sind. In den zahlreichen Arbeiten, die sich mit den Alkaloiden des Mutterkorns befassen, finden sich auch eine Reihe von Angaben über das Vorkommen von einfachen Stickstoffbasen. So fanden G. BARGER (1887) und A. J. EWINS (1914a, b) Trimethylamin. Sie hielten es für einen Abkömmling des Cholins bzw. Acetylcholins. G. BARGER und H. H. DALE (1909) berichten über das Vorkommen von i-Amylamin, Putrescin, Cadaverin und Tyramin. Sie fanden alle diese Basen bei der Untersuchung der wasserlöslichen Bestandteile des frischen Mutterkorns. Bei C. REUTER (1912) werden einige Arbeiten zitiert, welche über das Vorhandensein von Methylamin berichten: GANSER (1870) und LUDWIG (1909). Ersterer hält diese Base aber im Gegensatz zu letzterem für nicht präformiert. Histamin wurde von G. BARGER (1910), FR. KUTSCHER (1910) und F. PYMAN (1911) gefunden. O. GESSNER schließlich führt in seinen „Gift- und Arzneipflanzen

Mitteleuropas" (1953) neben den oben genannten Aminen außerdem noch Aethylamin an, allerdings ohne eine Originalarbeit zu zitieren. Angaben über das Vorkommen von weiteren Aminen im Mutterkorn haben wir nicht gefunden. Die gesamte die Amine und Aminosäuren des Mutterkorns betreffende Literatur haben vor kurzem D. Gröger und U. Mothes (1956) referiert (s. a. M. Steiner u. E. Stein v. Kamienski, 1955).

Der „Trimethylamin"-Geruch, welcher beim Befeuchten von Mutterkorn mit KOH auftritt, wird bekanntlich lebensmittelchemisch zum Nachweis von Mutterkorn im Mehl benutzt.

Da nach den Angaben der Literatur im Mutterkorn offenbar eine Vielzahl von Aminen zu erwarten war, schien uns eine sorgfältige Untersuchung mit Hilfe unseres Trennungs- und Nachweisverfahrens wünschenswert. Dabei konnten wir natürlich nur die mit Wasserdampf flüchtigen Basen, nicht aber Histamin, Tyramin, Cadaverin und Putrescin erfassen.

### *II. Ergebnisse*

Es wurden Mutterkornproben verschiedener Herkunft und verschiedenen Alters untersucht. Die Sclerotien (10—20 g) wurden im Starmix zerkleinert und in üblicher Weise aus alkalischem Medium destilliert. Eine Übersicht über die Ergebnisse, jeweils Mittelwerte mehrerer Analysen, gibt Tabelle 5.

Tabelle 5. *Amine in Mutterkorn*

| Amine (γ/g Trg.) | Mutterkorn Nr. | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Methyl- | 10 | 20 | 30 | 20 |
| Trimethyl- | 50 | 25 | 2 | 60 |
| Aethyl- | 120 | 50 | 55 | 90 |
| n-Propyl- / i-Propyl- | 2 | 4 | 5 | 4 |
| i-Butyl- | 30 | 5 | 20 | 30 |
| i-Amyl- | 70 | 40 | 35 | 90 |
| n-Hexyl- | — | 5 | 5 | 20 |
| β-Phenylaethyl- | 10 | 10 | 2 | 10 |
| $NH_3$ | 200 | 200 | 300 | 200 |

1. Mutterkorn, Aug. 1952 von Roggenfeldern der Umgebung von Hinterzarten (Schwarzwald) gesammelt. Ohne besondere Vorsichtsmaßregeln gelagert.

2. Mutterkorn, deutscher Herkunft, Ernte 1953, als Ganzdroge aus dem Handel bezogen.

3. Mutterkorn, deutscher Herkunft, Ernte 1952, als gepulverte Droge aus dem Handel bezogen.

4. Mutterkorn, portugiesischer Herkunft, Ernte 1953, als Ganzdroge aus dem Handel bezogen.

Sämtliche Proben wurden im August 1953 analysiert.

Mit Ausnahme von Dimethylamin sind im Mutterkorn alle flüchtigen Amine enthalten, die von uns überhaupt in Pflanzen nachgewiesen werden konnten. Abgesehen von Pilzautolysen konnten in keinem

Untersuchungsmaterial derartig viele Amine nebeneinander nachgewiesen werden. Das Mutterkorn muß demnach einen sehr regen Aminstoffwechsel haben.

In der Literatur wird mehrfach darüber berichtet, daß sich die chemische Zusammensetzung des Mutterkorns während der Lagerung stark verändert, besonders dann, wenn Feuchtigkeit nicht sorgfältig ausgeschlossen wird. Es wurden deshalb einige Versuche durchgeführt, in denen verschiedene Mutterkorn-Muster zu 20 g ausgewogen und offen in Petrischalen auf dem Dachboden des Institutes aufgestellt wurden. Von Dezember 1953 bis März 1955 wurde in Abständen von etwa einem Monat je eine Probe aufgearbeitet. Gewisse Amine (z. B. Aethyl- und Trimethylamin) erfuhren während des Versuchsabschnittes eine deutliche Zunahme. Auffallender aber war die Tatsache, daß fast bei allen Aminen von etwa April bis Juli (1954) ein sehr deutliches Gehaltsminimum beobachtet wurde. Merkwürdigerweise zeigte sich dieses auch bei der grob gepulverten Droge. Wir wollen uns hier mit dieser kurzen Andeutung begnügen. Weitere Versuche hierüber sind im Gange, über die bei gegebener Gelegenheit später berichtet werden soll.

*III. Der Nachweis von n- und i-Propylamin und von n-Hexylamin*

Von den in Tabelle 5 aufgezählten Aminen konnten Methyl-, Aethyl-, Trimethyl-, Butyl-, i-Amyl- und $\beta$-Phenylaethylamin durch papierchromatographische Trennung und Darstellung der 2,4-Dinitro-$\alpha$-naphthol-Verbindungen einwandfrei und leicht nachgewiesen werden.

Größere Schwierigkeiten bereitete die Identifizierung der übrigen Amine, die bisher *nur* im Mutterkorn angetroffen wurden (s. a. M. Steiner u. E. Stein v. Kamienski, 1955).

*a) n-Hexylamin.* In den Destillaten von Mutterkorn kam ein Amin vor, das nach seinem $R_f$-Wert n-Hexyl- oder n-Heptylamin sein konnte. Da der $R_f$-Wert dieser Amine sich nur um 2 unterscheidet, ist eine sichere Diagnose aus dem Chromatogramm nicht möglich. Auch die Identifizierung über die Dinitro-$\alpha$-naphtholate versagt in diesem Falle, da sich die n-Hexyl- und n-Heptylamin-Verbindungen weder in ihrer Krystallform noch in ihrem Schmelzpunkt genügend unterscheiden. Ihre Mischung gibt auch kein Eutektikum:

| | |
|---|---|
| Reines n-Hexylamin, | 2,4-Dinitro-naphthol-Verbindung Fp. 150° |
| Reines n-Heptylamin, | 2,4-Dinitro-naphthol-Verbindung Fp. 152° |
| Mischung 50/50 | 2,4-Dinitro-naphthol-Verbindung Fp. 150° |

Nach zahlreichen Versuchen wurde gefunden, daß die *Pikrolonate* dieser beiden Amine Schmelzpunkte zeigen, die um 26—27° auseinanderliegen. Die Eutektika dieser Aminpikrolonate mit Benzanilid (Fp. 163°) und Salophen (Fp. 190°), nach der Methode von L. und A. Kofler (1954)

Tabelle 6. *Schmelzpunkte der Pikrolonate von n-Hexyl- und n-Heptylamin*

| | n-Hexylamin | n-Heptylamin | Amin aus Mutterkorn |
|---|---|---|---|
| Pikrolonat . . . . . | 188—189° | 162° | 188—189° |
| Pikrolonat + Salophen . . | 160° | 142—143° | 160° |
| Pikrolonat + Benzanilid . | 138° | 127—128° | 137—138° |

bestimmt, bieten weitere Unterscheidungsmerkmale. Tabelle 6 bringt die Ergebnisse im Vergleich mit dem Mutterkornamin.

Vielfach wiederholte Versuche lieferten immer wieder die gleichen Ergebnisse. Es kann also mit einem sehr hohen Grad von Sicherheit gesagt werden, daß die fragliche Base im Mutterkorn *n-Hexylamin* ist.

*b) n- und i-Propylamin.* Erheblich größere Mühe bereitete die Aufklärung eines zweiten Ninhydrin-positiven Fleckes im Chromatogramm der Mutterkornamine. Er lag etwa an der Stelle, die von n- und i-Propylamin eingenommen wird.

Auch die beiden Propylamine zeigen nur eine geringe Differenz der $R_f$-Werte (etwa 2). Sie können daher chromatographisch nicht getrennt werden. Bei gleichzeitigem Vorkommen fallen ihre Flecken zusammen. Liegt n- bzw. i-Propylamin einzeln vor, so ist eine Identifizierung durch die sublimierten Krystalle der 2,4-Dinitro-α-naphthol-Verbindung und den Schmelzpunkt unschwer möglich.

Dagegen lieferte die Dinitro-α-naphthol-(DNN-) Verbindung des Amins aus *Claviceps* Sublimate, die Mischformen zwischen den beiden Propylaminen zeigten. Oft ließen sich in einem Präparat sogar recht gut die schiefwinkeligen Plättchen des n-Propylamins neben den Nadeln und kurzen Prismen des i-Propylamins erkennen (Abb. 4, 7 und 8). Vergleichspräparate mit Gemischen von reinem n- und i-Propylamin (50/50) ergaben das gleiche Bild (Abb. 3, 5 und 6).

Auch die Schmelzpunkte der Dinitro-α-Naphthol-Verbindungen sprechen sehr für das Vorliegen eines Gemisches von n- und i-Propylamin (Tabelle 7).

Tabelle 7. *2,4-Dinitro-α-Naphthol-Derivate*

| | | |
|---|---|---|
| i-Propylamin, rein . . . . . | Fp. 135—152° | (unscharf) |
| n-Propylamin, rein . . . . . | Fp. 156° | (scharf) |
| n- + i-Propylamin (50/50) . . . | Fp. 130—150° | (unscharf) |
| Amin aus dem Mutterkorn . . . | Fp. 130—145° | (unscharf) |

Weitere Anhaltspunkte für die Identifizierung lieferten Trinitro-m-kresol-Verbindungen, deren Schmelzpunkte in Tabelle 8 aufgeführt sind.

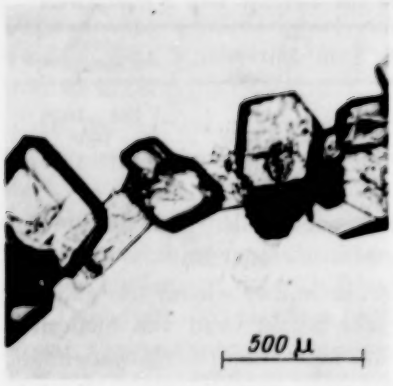



Abb. 3. n- + i-Propylamin (50/50), DNN-Verbindung

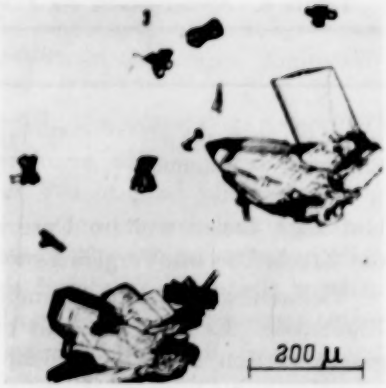



Abb. 4. Amin aus Mutterkorn, DNN-Verbindung

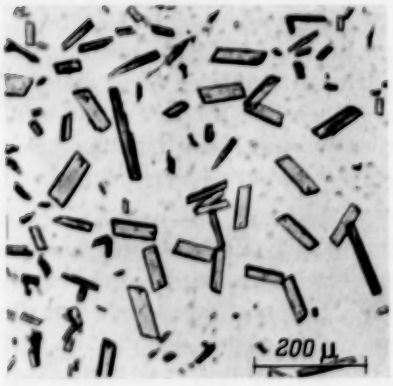



Abb. 5. Wie Abb. 3, sublimiert

Abb. 6. Wie Abb. 5, anderes Präparat

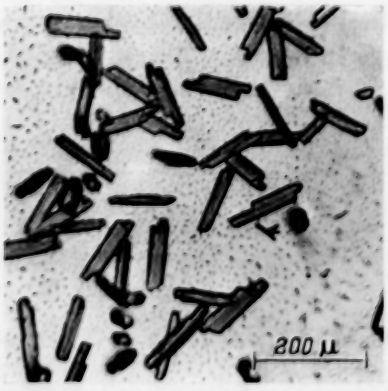



Abb. 7. Wie Abb. 4, sublimiert

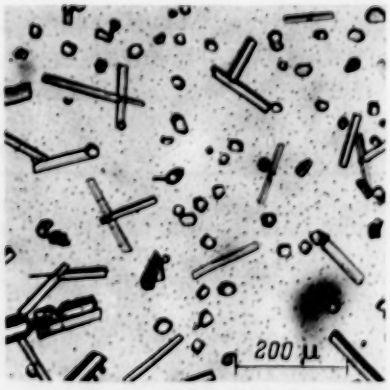



Abb. 8. Wie Abb. 7, anderes Präparat

Tabelle 8. *Trinitro-m-kresol-Derivate*

| | | |
|---|---|---|
| i-Propylamin, rein . . . | Fp. 145—147° | (scharf) |
| dasselbe + Benzanilid . . | Fp. 112—113° | (scharfes Eutektikum) |
| n-Propylamin, rein . . . | Fp. 160° | (scharf) |
| dasselbe + Benzanilid . . | Fp. 123° | (scharfes Eutektikum) |
| i- + n-Propylamin (50/50) | Fp. 125—135° | (sehr unscharf, erst bei 160° alles geschmolzen) |
| dasselbe + Benzanilid . . | Fp. 110—115° | (kein scharfer Beginn, bei 115° alles geschmolzen) |
| Amin aus dem Mutterkorn | Fp. 126—160° | (sehr unscharf) |
| dasselbe + Benzanilid . . | Fp. 112—120° | (sehr unscharf, kein deutlicher Beginn) |

Das zweite „unbekannte" Amin aus dem Mutterkorn ist demnach höchstwahrscheinlich ein Gemisch von *n- und i-Propylamin*.

## F. Zur Biochemie der Aminentstehung

### *I. Schrifttum*

Über die Entstehung der biogenen Amine wird an Hand des einschlägigen Schrifttums in der Monographie von M. Guggenheim (1951) ausführlich berichtet. Im folgenden wird nur kurz auf die Bildungswege für diejenigen Amine eingegangen, die in unserer Arbeit in den untersuchten Pflanzen nachgewiesen wurden, also für die primären Monoalkylamine, $\beta$-Phenylaethylamin, Dimethylamin und Trimethylamin. Wegen aller übrigen, damit im weiteren Zusammenhang stehenden Fragen darf auf das oben zitierte Werk verwiesen werden.

Es gibt 3 verschiedene Wege, auf denen die genannten Amine entstehen können:

1. durch Aminierung stickstofffreier Verbindungen, z. B. von Aldehyden, Ketonen;

2. durch Umwandlung von Aminosäuren, die zur stärkeren Ausprägung ihrer basischen Eigenschaften führen;

3. durch Spaltung anderer stickstoffhaltiger Verbindungen, z. B. des Cholins.

**1. Aminierung von Aldehyden und Ketonen.** Analog zur Bildung der Aminosäuren durch reduktive Aminierung von $\alpha$-Keto-mono- und dicarbonsäuren, können auch Aldehyde und Ketone in die entsprechenden Amine übergeführt werden. Durch Ammoniak-Anlagerung an die Carbonylgruppe unter Wasseraustritt werden zunächst Iminoverbindungen gebildet, die in vitro bei Gegenwart geeigneter Katalysatoren

(Ni, Pd) unter Reduktion in die entsprechenden Amine überführt werden können, entsprechend folgender Formulierung:

$$\underset{\text{Aldehyd}}{R{-}CHO} \xrightarrow[-H_2O]{+NH_3} \underset{\text{Aldimin}}{R{-}CH{=}NH} \xrightarrow{+H_2} \underset{\text{Amin}}{R{-}CH_2{-}NH_2}$$

$$\underset{\text{Keton}}{R{-}CO{-}R'} \xrightarrow[-H_2O]{+NH_3} \underset{\text{Ketimin}}{R{-}\overset{\displaystyle NH}{\overset{|}{C}}{-}R'} \xrightarrow{+H_2} \underset{\text{Amin}}{R{-}CH(NH_2){-}R'}$$

Formaldehyd kann auch ohne Mitwirkung eines Katalysators aminiert werden, indem die Hydrierung des Formaldehydimins durch überschüssigen Formaldehyd erfolgt, der in Form seines Hydrates als Wasserstoffdonator wirkt und dabei in Ameisensäure übergeht, nach folgender Formulierung:

$$\underset{\text{Formaldehyd}}{CH_2O} \xrightarrow[-H_2O]{+NH_3} \underset{\text{Formaldehydimin}}{CH_2{=}NH}$$

$$\underset{\text{Formaldehydimin}}{CH_2{=}NH} + \underset{\text{Formaldehydhydrat}}{CH_2(HO)_2} \longrightarrow \underset{\text{Methylamin}}{CH_3{-}NH_2} + \underset{\text{Ameisensäure}}{HCO_2H}$$

Indem sich diese Vorgänge wiederholen, können über Methylamin Dimethylamin, schließlich Trimethylamin und sogar die quartäre Ammoniumbase Tetramethylammoniumhydroxyd entstehen.

$$\underset{\text{Methylamin}}{CH_3{-}NH_2} \xrightarrow[-H_2O]{+CH_2O} \underset{\text{Methylimin}}{CH_3{-}N{=}CH_2} \xrightarrow{CH_2(OH)_2} \underset{\text{Dimethylamin}}{CH_3{-}NH{-}CH_3} + \underset{\text{Ameisensäure}}{HCO_2H}$$

Alle diese Reaktionen sind bisher im Organismus *nicht* nachgewiesen worden. Auch die grundsätzlich denkbare Entstehung von Aminen durch Transaminierung, also durch Gruppenübertragung zwischen einer Aminodicarbonsäure und einem Aldehyd oder Keton, ist bisher nicht experimentell belegt. Die bekannten Aminosäuren-Transaminasen sind jedenfalls nicht imstande, diese Reaktion in die Wege zu leiten.

Dafür, daß aber eine reduktive Aminierung von Aldehyden und Ketonen im Pflanzenorganismus *möglich* ist, gibt vielleicht die Entstehungsweise des Putrescins in *Atropa belladonna* einen Anhaltspunkt. Hier fanden W. O. JAMES und H. BEEVERS (1948) eine Polyphenolase, die Ornithin in α-Keto-δ-aminovaleriansäure überführt. Diese kann über γ-Aminobutyraldehyd unter reduktiver Aminierung Putrescin bilden, welches tatsächlich in *Atropa* mehrfach gefunden wurde.

$$\underset{\text{Ornithin}}{NH_2{-}(CH_2)_3{-}CH(NH_2){-}CO_2H} \xrightarrow[-NH_3,\,-2H]{+H_2O} \underset{\text{α-Keto-δ-aminovaleriansäure}}{H_2N{-}(CH_2)_3{-}CO{-}CO_2H}$$

$$\underset{\text{α-Keto-δ-aminovaleriansäure}}{H_2N{-}(CH_2)_3{-}CO{-}CO_2H} \xrightarrow{-CO_2} \underset{\text{γ-Aminobutyraldehyd}}{H_2N{-}(CH_2)_3{-}CHO} \xrightarrow[-H_2O]{+NH_3\ 2H} \underset{\text{Putrescin}}{H_2N{-}(CH_2)_4NH_2}$$

**2. Umwandlung von Aminosäuren.** Die einfachste Reaktion, die zur Bildung von Aminen führt, ist die Decarboxylierung von Aminosäuren. Durch Abspaltung von $CO_2$ entsteht das um ein C-Atom ärmere primäre Amin.

$$\underset{\text{Aminosäure}}{R{-}CH(NH_2)COOH} \xrightarrow{-CO_2} \underset{\text{Amin}}{RCH_2{-}NH_2}$$

Es liegt um so näher, diesen Weg für die Entstehung der natürlich vorkommenden Amine in Anspruch zu nehmen, als die meisten biogenen Amine ohne weiteres durch Decarboxylierung der weit verbreiteten natürlichen Aminosäuren entstanden sein könnten.

Bei Bakterien wurden bisher (s. das Sammelreferat A. JANKE, 1951) folgende Decarboxylierungsreaktionen angegeben, die zu Aminen führen, die im Rahmen dieser Arbeit zur Diskussion stehen:

$$\underset{\text{L(—) Valin}}{(CH_3)_2{-}CH{-}CH(NH_2){-}CO_2H} \xrightarrow{-CO_2} \underset{\text{i-Butylamin}}{(CH_3)_2{=}CH{-}CH_2{-}NH_2}$$ (C. NEUBERG, 1909)

$$\underset{\text{L(—) Leucin}}{(CH_3)_2{=}CH{-}CH_2{-}CH(NH_2){-}CO_2H} \xrightarrow{-CO_2} \underset{\text{i-Amylamin}}{(CH_3)_2{=}CH{-}CH_2{-}CH_2{-}NH_2}$$ (N. ARAI 1921)

$$\underset{\text{L(—) Phenylalanin}}{C_6H_5{-}CH_2CH(NH_2){-}CO_2H} \xrightarrow{-CO_2} \underset{\beta\text{-Phenyläthylamin}}{C_6H_5{-}CH_2{-}CH_2{-}NH_2}$$ (McGILVERY 1912)

E. F. GALE (1940) hat diese Ergebnisse mit zahlreichen Bakterienstämmen nachgeprüft. Er konnte keine Decarboxylierung der betreffenden Aminosäuren feststellen. In seinen umfangreichen Experimenten fand er lediglich Decarboxylasen, welche spezifisch auf folgende Aminosäuren eingestellt sind: Ornithin, Lysin, Arginin, Histidin, Glutaminsäure, Tyrosin, Dioxyphenylalanin. Auch in tierischen Geweben (H. BLASCHKO 1945) wurden hauptsächlich die gleichen, eben für Bakterien erwähnten Aminosäure-Decarboxylasen gefunden. Auch die zuerst zitierten Autoren (C. NEUBERG, M. ARAI und McGILVERY) konnten nur eine *sehr geringfügige* Decarboxylation der entsprechenden Aminosäuren feststellen. Zu 95% wurden diese oxydativ desaminiert.

Über die Entstehung von Aminen in höheren Pflanzen durch Decarboxylierung von Aminosäuren haben W. GRASSMANN und H. BAYERLE (1934) experimentiert. Sie versetzten den Brei oder Extrakt aminhaltiger Blüten mit Aminosäuren und analysierten die Aminfraktion nach der Methode von G. KLEIN und M. STEINER (1928). In keinem einzigen Falle ließ sich eine Aminbildung durch Decarboxylierung der zugesetzten Aminosäuren nachweisen. Es konnte lediglich festgestellt werden, daß aminhaltige Blüten, mehr als andere, aminfreie, die Aminosäuren oxydativ über die entsprechenden Aldehyde abbauen.

In höheren Pflanzen ist bisher überhaupt nur eine einzige Aminosäure-decarboxylase sichergestellt. Sie führt Glutaminsäure in $\gamma$-Aminobuttersäure über (O. SCHALES, V. MIMES 1946 und K. OKUNUKI 1937).

Die Entstehung der flüchtigen Alkylamine durch Decarboxylierung von $\alpha$-Monoaminosäuren ist also in keiner Weise experimentell sichergestellt.

**3. Spaltung von Cholin.** Durch einfache Spaltung von Cholin, das in vielen Pflanzen in freier Form vorkommt (M. GUGGENHEIM 1951, S. 111), könnte sehr leicht Trimethylamin entstehen:

$$\underset{\text{Cholin}}{HO{-}N(CH_3)_3{-}CH_2{-}CH_2{-}OH} \longrightarrow \underset{\text{Trimethylamin}}{(CH_3)_3N} + \underset{\text{Glycol}}{HOCH_2{-}CH_2{-}OH}$$

Bei höheren Pflanzen wurde diese zu Trimethyl führende Cholinspaltung erst ein einziges Mal nachgewiesen. P. T. CROMWELL (1949) fand in *Chenopodium vulvaria* ein Enzym, welches bei $p_H$ 7—8 gemäß obiger Formel Cholin zu Trimethylamin und Glycol spaltet.

Durch die Wirkung von Monoaminoxydasen kann das Trimethylamin weiter über Dimethyl- zu Methylamin abgebaut werden. Dieser Abbau geht im wesentlichen den umgekehrten Gang der Aminierung von Aldehyden, der weiter oben bereits besprochen wurde:

$$\underset{\text{Trimethylamin}}{2N(CH_3)_3} \xrightarrow{+O} \underset{\text{Dimethylimin}}{2CH_2 = N(CH_3)_2} + H_2O$$

$$\underset{\text{Dimethylimin}}{CH_2 = N(CH_3)_2} \xrightarrow{+H_2O} \underset{\text{Formaldehyd}}{H{-}CHO} + \underset{\text{Dimethylamin}}{NH(CH_3)_2}$$

und weiter in gleicher Art:

$$\underset{\text{Dimethylamin}}{2NH(CH_3)_2} \xrightarrow{+O} \underset{\text{Methylimin}}{2CH_2 = N{-}CH_3} + H_2O$$

$$\underset{\text{Methylimin}}{CH_2 = N{-}CH_3} \xrightarrow{+H_2O} \underset{\text{Formaldehyd}}{H{-}CHO} + \underset{\text{Methylamin}}{NH_2{-}CH_3}$$

Monoaminoxydasen sind im tierischen Organismus weit verbreitet (M. GUGGENHEIM 1951, S. 28). In höheren Pflanzen war ihr Vorkommen lange Zeit unsicher. Sie konnten weder in Kartoffelknollen oder Ricinussamen noch in Blättern von *Nasturtium officinale*, *Cichorium intybus*, noch in *Agaricus campestris* oder auch in Bierhefe nachgewiesen werden (H. BLASCHKO 1937). Erst vor kurzem gelang ein Nachweis dieses Enzyms in jungen Bohnenpflanzen (J. KENTEN 1952).

## *II. Eigene Ergebnisse*

1. Für die folgenden, bei unseren Untersuchungsobjekten nachgewiesenen Amine bestehen klare formale Beziehungen zu weitverbreiteten Aminosäuren:

bei Methylamin zu Glycocoll,

bei Aethylamin zu Alanin,

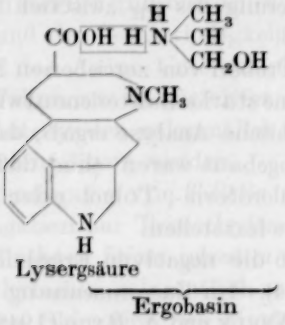
bei n-Propylamin zu α- bzw. γ-Aminobuttersäure,
bei i-Butylamin zu Valin und
bei i-Amylamin zu Leucin.

Im Zusammenhang mit dem Vorkommen von n-Propylamin im Mutterkorn ist erwähnenswert, daß D. Gröger und U. Mothes (1956) in dem gleichen Objekt regelmäßig freie α- und γ-Aminobuttersäure nachweisen konnten.

Keine derartigen Beziehungen zu bekannten, natürlich vorkommenden Aminosäuren lassen sich für das n-Hexylamin und das i-Propylamin angeben.

Beim Hexylamin wäre als Ausgangssubstanz ein bisher unbekanntes Homo-nor-leucin [$CH_3(CH_2)_4CHNH_2COOH$] anzunehmen. Seine Decarboxylierung würde zum n-Hexylamin führen.

Das i-Propylamin ließe sich in gleicher Weise auf β-Aminobuttersäure [$CH_3CHNH_2CH_2COOH$] zurückführen; auch diese Aminosäure ist bisher u. W. in der Natur nicht gefunden worden. Es läßt sich allerdings auch eine andere Entstehungsweise denken. Das Ergobasin, eines der wasserlöslichen Mutterkornalkaloide, liefert bei der hydrolytischen Spaltung Lysergsäure und L-2-Aminopropanol. Diese beiden Spaltstücke sind im Alkaloidmolekül amidartig verknüpft:




Der Aminopropanolrest könnte, rein formal gesehen, unter Reduktion das i-Propylamin liefern.

2. Daß das in Pflanzen *vorgefundene Trimethylamin* durch Cholinspaltung entsteht, ist nach den Untersuchungen von B. T. Cromwell (1949) sehr wahrscheinlich. Aus *Trimethylamin* könnte nach dem auf S. 348 angedeuteten Schema durch oxydative Entmethylierung *Dimethylamin*, aus diesem *Methylamin* gebildet werden. Das mehrfach in dieser Arbeit beobachtete gemeinsame Vorkommen von *Trimethyl-*, *Dimethyl-* und *Methylamin* ließe sich im Sinne einer gemeinsamen Entstehung deuten.

3. Wir selbst haben einige Versuche über die Bildung von Monoalkylaminen aus Aminosäuren durchgeführt.

Als Versuchsmaterial dienten Pflanzenteile, bei denen das Vorkommen von mehreren Aminen in größeren Mengen festgestellt worden war: Blüten von *Sorbus aucuparia*, *Crataegus monogyna*, *C. fecunda* und Sclerotien von *Claviceps purpurea*.

Die abgewogenen Pflanzenteile wurden unter Zugabe von etwas Wasser im Homogenisator in einen feinen Brei verwandelt. Gleiche Proben hiervon wurden in 50-ml Erlenmeyerkolben mit 1%igen Lösungen verschiedener Aminosäuren (Leucin, Valin, Alanin) oder Cholin-hydrochlorid versetzt und für verschiedene Zeiten in den Thermostaten bei 30° gebracht. Ein Teil der Ansätze wurde mit Antiseptica (Thymol, Chloroform, NaF) versetzt. Nach der gewählten Inkubationszeit wurden die Ansätze nach der früher beschriebenen Weise auf Amine aufgearbeitet. Zur Kontrolle diente Organbrei ohne Substratzusatz.

Die Ergebnisse lassen sich sehr kurz wiedergeben: *sie waren in allen Fällen völlig negativ.* In keinem einzigen Falle war ein Unterschied zwischen den Ansätzen mit Substratzugabe und den Kontrollansätzen feststellbar.

Bei *Claviceps purpurea* wurden sowohl Organbrei als auch Wasser- und Äthanol-Extrakte der Sclerotien geprüft. Auch hier konnte in keinem einzigen Falle durch Aminosäure-Zusatz ein Ansteigen des Amingehaltes erzielt werden. Eine Änderung des $p_H$ zwischen 5,6 und 7,8 (Phosphatpuffer) war ohne Einfluß.

In den mit Thymol versetzten Proben von zerriebenen Mutterkorn-Sclerotien war nach etwa 6 Tagen eine starke Bakterienentwicklung feststellbar. Eine papierchromatographische Analyse ergab, daß die zugesetzten Aminosäuren vollständig abgebaut waren, ohne daß Amine gebildet wurden. In Ansätzen mit Chloroform-, Toluol- oder NaF-Zusatz ließ sich kein Abbau der Aminosäure feststellen.

Unsere Versuche bestätigen also die negativen Ergebnisse von W. Grassmann und H. Bayerle (1934). Im Zusammenhang damit darf darauf hingewiesen werden, daß E. Werle und A. Raub (1948) bei jungen Spinatpflanzen einen deutlichen Anstieg des Histamingehaltes fanden, wenn diese Pflanzen 2—4 Tage lang in 0,02 molare Histidin-Lösung getaucht wurden. Wäßrige Auszüge oder der Brei von Spinatpflanzen waren hingegen nicht befähigt, Histidin zu Histamin zu decarboxylieren.

Unsere soeben beschriebenen Versuche tragen durchaus orientierenden Charakter. Ihre Weiterführung und Vertiefung lag außerhalb des Rahmens dieser Arbeit.

## Zusammenfassung

1. Mit Hilfe der von E. Stein v. Kamienski (1957a, b) angegebenen Methoden wurden Fruchtkörper höherer Pilze, Brandpilzsporen und einige Flechten auf das Vorkommen flüchtiger Amine untersucht.

2. Die Fruchtkörper von 105 untersuchten Pilz-Arten (aus 18 Familien) wurden geprüft. 44 Arten enthielten mit Sicherheit Amine.

3. Im einzelnen wurden folgende Amine gefunden:
Methylamin in 22 Arten,
Dimethylamin in 10 Arten,
Trimethylamin in 8 Arten,
i-Amylamin in 19 Arten,
$\beta$-Phenylaethylamin in 4 Arten.
Methylamin ist in Spuren, wie bei Blütenpflanzen, anscheinend weit verbreitet.

Bei einigen Pilzen wurden deutliche Hinweise für das Vorhandensein von freiem Aethanolamin gefunden.

4. Innerhalb einer Pilzart unterliegt Art und Menge der vorgefundenen Amine je nach Entwicklungszustand, Standort, Jahreszeit usw. weitgehenden Schwankungen.

5. Bei der Autolyse von Fruchtkörpern einiger Arten tritt eine Vielzahl von Aminen auf. Außer den unter 3. genannten Aminen wurden hier auch Aethylamin und i-Butylamin festgestellt.

Die Art der bei der Autolyse gebildeten Amine scheint spezifisch zu sein. Bei manchen Arten wurden überhaupt keine Amine gebildet.

Zwischen sterilen und unsterilen Ansätzen ergaben sich nur bezüglich der Menge und der Geschwindigkeit des Auftretens, nicht aber hinsichtlich der Art der Amine Unterschiede. Lediglich Trimethylamin wurde in einigen Fällen nur in unsterilen Ansätzen gefunden.

Ein in Autolysaten gelegentlich auftretendes Amin konnte nicht mit Sicherheit identifiziert werden.

6. In Brandsporen von *Tilletia tritici* konnte in Bestätigung früherer Literaturangaben nur Trimethylamin gefunden werden.

7. Die Flechten *Sticta sylvatica* und *St. fuliginosa* enthalten Methyl- und Trimethylamin, gelegentlich auch noch Dimethylamin.

8. In den Sklerotien des Mutterkorns wurde Methyl-, Trimethyl-, Aethyl-, n-Propyl-, i-Propyl-, i-Butyl-, i-Amyl-, n-Hexyl- und $\beta$-Phenylaethylamin festgestellt.

Die Identifizierung von n- und i-Propylamin und von n-Hexylamin erforderte die Anwendung besonderer Methoden.

9. Die Biochemie der Aminentstehung wird diskutiert.

Einige orientierende Versuche mit Gewebebrei von Blüten und Pilzen, eine Decarboxylierung von Aminosäuren zu erhalten, gaben nur negative Resultate.

## Literatur

Arai, M.: Biochem. Z. **122**, 251 (1921). — Barger, G.: J. Chem. Soc. (Lond.) **95**, 1720 (1909); **97**, 2592 (1910). — Barger, G., and H. N. Dale: J. of Physiol. **38**, Proc. 77 (1909). — Blaschko, H.: Adv. Enzymol. **5**, 67 (1945). — Briegner,

L.: Z. physiol. Chem. **11**, 184 (1887). — Cohen, P.: J. of Biol. Chem. **136**, 565 (1940). — Ewins, A. J.: Biochemic. J. 8, 44 (1914a); 8, 366 (1914b). — Gale, E. F.: Biochemic. J. **34**, 846 (1940). Adv. Enzymol. **6**, 1 (1946). — Ganser: Arch. Pharmac. **194**, 195 (1870). — Zit. nach C. Reuter 1912. — Gröger, D., u. U. Mothes: Pharmazie **11**, 323 (1956). — Guggenheim, M.: Die biogenen Amine. Basel 1951. — Guggisberg: H.: Mutterkorn. Vom Gift zum Heilstoff. Basel 1954. — Grassmann, W., u. H. Bayerle: Biochem. Z. **268**, 220 (1934). — Hanna, W. F., H. B. Vickery and G. W. Pucher: J. of Biol. Chem. **97**, 351 (1932). — Jahn, H., Pilze rundum. Hamburg 1949. — James, W. O., and H. Beevers: Biochemic. J. **43**, Proc. 11 (1948). — Janke, A.: Arch. Mikrobiol. **15**, 472 (1951). — Kenten, R. H., and P. Mann: Biochemic. J. **50**, 360 (1952). — Kofler, L. u. A.: Thermo-Mikro-Methoden. Weinheim 1954. — Kussmaul u. Bornträger: Neues Jb. Pharmacie **24**, 242 (o. J.). Zit. nach C. Reuter 1912. — Kutscher, F.: Zbl. Physiol. **24**, 163 (1910). — Ludwig: Arch. exper. Path., u. Pharmakol. **61**, 1—3 (1909). Zit. nach C. Reuter 1912. — McGilvery, R. W., and P. Cohen: J. of Biol. Chem. **174**, 813 (1948). — Neuberg, C., u. L. Karczag: Biochem. Z. **18**, 435 (1909). — O'Kane, D., and I. C. Gunsalus: J. of Biol. Chem. **170**, 425 (1947). — Okunuki, K.: Bot. Mag. (Tokyo) **51**, 270 (1937). Zit. nach Guggenheim, S. 257. 1951. — Pyman, Fl.: J. Chem. Soc. (Lond.) **99**, 668 (1911). — Rechenberger, J.: Z. physiol. Chem. **265**, 275 (1940). — Reuter, C.: Z. physiol. Chem. **78**, 167 (1912). — Schales, O., and V. Mimes: Arch. of Biochem. **10**, 455 (1946). — Schales, O., and S. S. Schales: Arch. of Biochem. **11**, 155 (1946). — Stein v. Kamienski, E.: Planta (Berl.) **50**, 291 (1957a); **50**, 315 (1957b). — Steiner, M., u. E. Stein v. Kamienski: Naturwiss. **42**, 345 (1955). — Stoll, A.: Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe **9** (1952). — Trier, G.: Z. physiol. Chem. **73**, 383 (1911). — Walz: Neues Jb. Pharmacie **2**, 32 (1854). Zit. nach C. Reuter 1913. — Winterstein, E.: Die Amine. In G. Kleins Handbuch der Pflanzenanalyse, Bd. 4/1, S. 228. Wien 1933. — Werle, E. U., u. A. Raub: Biochem. Z. **318**, 538 (1948).

Dr. Elard Stein von Kamienski,
Max-Planck-Institut für vergleichende Erbbiologie und Erbpathologie,
Abt. für Gewebezüchtung, Berlin-Dahlem, Garystr. 9

Planta, Bd. 50, S. 353—358 (1958)

Aus dem Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln-Vogelsang

# BEOBACHTUNGEN ÜBER DEN TRYPTOPHANABBAU DURCH PILZE

Von

P. Schwarze und N. O. Frandsen

Mit 3 Textabbildungen

*(Eingegangen am 11. August 1957)*

Es ist bekannt, daß viele Pilze wenig wählerisch hinsichtlich der N-Quelle im Nährsubstrat sind und sowohl Nitrat- und Ammonium-N als auch organische N-Verbindungen der verschiedensten Form ausnutzen können. In vielen Fällen genügt eine einzige Aminosäure für die Deckung des gesamten N-Bedarfs. Die Verwendung des darin gebundenen Stickstoffs zur Eiweißsynthese setzt einen Abbau dieser Aminosäure unter Abspaltung des Stickstoffes in assimilierbarer Form durch Desaminierung oder andere Prozesse voraus. In der vorliegenden Arbeit werden Beobachtungen über den Abbau von Tryptophan mitgeteilt, die bei der Kultur von *Penicillium notatum* und einigen anderen Pilzen auf Nährböden mit dieser Aminosäure als alleiniger oder zusätzlicher N-Quelle gemacht wurden.

## Material und Methoden

Die Mehrzahl der Versuche wurde mit einer vom Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, bezogenen Kultur von *Penicillium notatum* Westl. durchgeführt. Für weitere Versuche mit mehr orientierendem Charakter wurden benutzt *Penicillium digitatum* Sacc., isoliert aus *Citrus*, *Cercospora beticola* Sacc., isoliert von Zuckerrüben, *Alternaria solani* (Ellis et Martin) Sorauer, isoliert aus *Solanum tuberosum* L. und *Alternaria porri* (Ellis) Saw., bezogen aus dem Commonwealth Mycological Institute, Kew.

Das Grundnährsubstrat (Czapek-Dox) enthielt im Liter:

2,0 g $NaNO_3$
1,0 g $K_2HPO_4$
0,5 g KCl
0,5 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
0,01 g $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$
30,0 g Saccharose

Bei *Penicillium digitatum*, das $NH_4^+$ besser als $NO_3^-$ ausnutzt, wurde Nitrat durch Ammoniumchlorid ersetzt.

Die Kulturen wurden in 50 cm³-Erlenmeyerkolben mit je 20 cm³ Nährlösung angesetzt, und zwar wurden 3 Varianten dieser Nährlösung benutzt, 1. die Originallösung, 2. eine Lösung mit der halben Nitratmenge und 3. eine Lösung ohne Nitrat. In jedes Kölbchen wurden zusätzlich 100 mg Tryptophan gegeben. Bei den Kontrollen unterblieb der Zusatz von Tryptophan, bei weiteren mit Tryptophan versetzten Lösungen unterblieb die Beimpfung, um Aufschluß über eventuelle spontane

Veränderungen des Tryptophans unter den gewählten Bedingungen zu erhalten. Je Versuchsglied wurden zwei Wiederholungen angesetzt. Da sich beim Autoklavieren von Tryptophan in Gegenwart von Zucker wachstumshemmende Stoffe bilden können (Hill und Patton 1947), wurde die Aminosäure erst nach der Sterilisierung im Autoklaven in die noch heißen (90—95°) Kölbchen gegeben. Nach dem Erkalten erfolgte die Beimpfung in der üblichen Weise. Bis auf seltene Ausnahmen wurden Fremdinfektionen nicht beobachtet. Die Kulturen wuchsen bei Zimmertemperatur (20° + 2°) heran, eine Serie befand sich im Dunkeln, eine andere im gedämpften Tageslicht.

Zu Beginn des Versuches und fortlaufend in Abständen von 3 Tagen wurden 1 $cm^3$-Proben des flüssigen Mediums entnommen und zunächst eingefroren. Nach Entnahme der letzten Probe am 15. Tag nach der Beimpfung erfolgte die papierchromatographische Untersuchung. Es wurde nach der absteigenden Methode gearbeitet. Der Wanderungsweg des Lösungsmittels betrug etwa 40 cm. Entwickelt wurde mit dem bewährten Butanol-Essigsäure-Wasser-Gemisch nach Partridge. Durch Besprühen mit Ehrlichs Reagens, Ninhydrin und Nitrit + Naphthylamin sowie durch Bestrahlen mit gefiltertem UV wurden die Stoffe sichtbar gemacht (Hellmann 1951, Wiss und Hellmann 1953).

## Ergebnisse

Abb. 1 zeigt in schematischer Wiedergabe drei solcher Chromatogramme. Von links nach rechts sind in zeitlicher Reihenfolge die Abnahmen 1—6 und jeweils eine Kontrolle ($K$) aufgetragen. Das linke Chromatogramm ist mit Ehrlichs Reagens, das mittlere mit Ninhydrin und das rechte mit Nitrit + Naphthylamin besprüht. Die Kontrollösung, aus einem unbeimpften Kolben am 15. Tag der Inkubation entnommen, gibt mit Ehrlichs Reagens nur den blauvioletten Tryptophanfleck. Bei den Abnahmen 1—4 nehmen Größe und Intensität dieses Fleckes laufend ab, bei der Abnahme 6 fehlt er fast völlig (aus platzmäßigen Gründen wurde die Abnahme 5 nicht aufgetragen). Das Tryptophan wird also durch den Pilz abgebaut oder so stark verändert, daß es die Ehrlich-Reaktion nicht mehr gibt. In dem Maße, wie der Tryptophanfleck verschwindet, tritt ziemlich dicht hinter diesem ein intensiv orange gefärbter Fleck auf. Diese Substanz färbt sich beim Besprühen mit Ninhydrin violett und nimmt an Größe und Intensität zu, wie das Tryptophan abnimmt (Abb. 1b). Sie läßt sich ferner mit Nitrit und Naphthylamin in einen carminroten Farbstoff überführen (Abb. 1c). Während unter der UV-Lampe Tryptophan eben noch als dunkelvioletter Fleck zu erkennen ist, fluoresciert die neugebildete Substanz intensiv hellblau. Größe und Intensität des fluorescierenden Fleckes nehmen wiederum mit der Dauer der Inkubation zu (Abb. 2). Die Fluorescenz, die Färbung mit Ehrlichs Reagens und Ninhydrin, die Kupplungsreaktion sowie der im Vergleich zum Tryptophan nur wenig niedrigere und, wie in einem anderen Versuch gezeigt werden konnte, mit dem des Kynurenins übereinstimmende $R_f$-Wert beweisen, daß es sich um diese Aminosäure handelt.

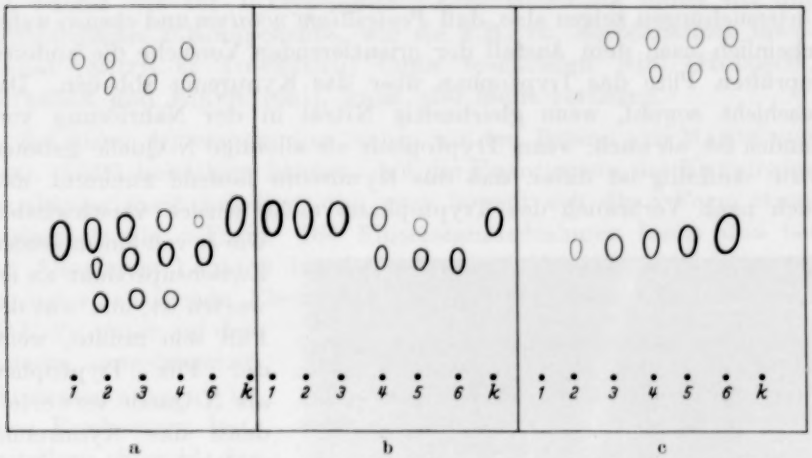



Abb. 1 a—c. Tryptophanabbau durch *Penicillium notatum*. Nährlösung ohne Nitrat mit 100 mg DL-Tryptophan je Kölbchen. *1—6*: Abnahmen zu Beginn (1) und fortlaufend in Abständen von 3 Tagen. *K*: unbeimpfte Kontrolle. a Mit Ehrlichs Reagens, b mit Ninhydrin, c mit Nitrit- und Naphthylaminlösung besprüht

Neben dem Kynurenin zeigt das Chromatogramm drei weitere Umwandlungsprodukte des Tryptophans, zwei mit hohem und eines mit niedrigem $R_f$-Wert (Abb. 1). Von den beiden rascher wandernden Stoffen ist der vorauseilende wahrscheinlich Anthranilsäure (blau-violette Fluorescenz, citronengelbe Färbung mit Ehrlichs Reagens, keine Reaktion mit Ninhydrin, carminrote Färbung mit dem Kupplungsreagens), der in kurzem Abstand folgende Oxyanthranilsäure (violette Färbung mit Ehrlichs Reagens, Reaktion mit Ninhydrin negativ, Kupplungsreaktion sehr schwach). Ein langsamer als das Kynurenin wandernder Stoff, der sich mit Ehrlichs Reagens braun färbt, tritt schon kurz nach der Inokulation auf und ist zur Zeit der letzten Abnahme wieder verschwunden.

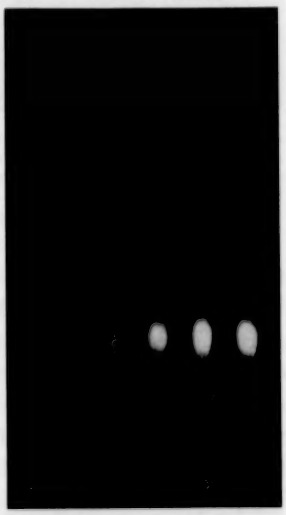


Abb. 2. Abbau von DL-Tryptophan durch *Penicillium notatum*. Aufnahme eines unbehandelten Chromatogrammes im UV (Hanauer Analysenlampe). Nährsubstrat: 20 cm³ Grundnährlösung mit der halben Nitratmenge und 100 mg Tryptophan. *1*: unbeimpfte Kontrolle; *1—5*: Abnahmen zu Beginn und fortlaufend mit 3 Tagen Abstand

In Versuchen mit anderen Pilzen, über die später berichtet werden soll, wurden weitere, im Höchstfall 8 verschiedene Tryptophan-Umwandlungsprodukte auf dem Chromatogramm festgestellt. Diese

Untersuchungen zeigen also, daß *Penicillium notatum* und ebenso wahrscheinlich nach dem Ausfall der orientierenden Versuche die anderen geprüften Pilze das Tryptophan über das Kynurenin abbauen. Das geschieht sowohl, wenn gleichzeitig Nitrat in der Nährlösung vorhanden ist, als auch, wenn Tryptophan als alleinige N-Quelle geboten wird. Auffällig ist dabei, daß das Kynurenin laufend zunimmt und auch nach Verbrauch des Tryptophans nicht wieder verschwindet, wie es von einem echten Zwischenprodukt zu erwarten ist, und was der Fall sein müßte, wenn der Pilz Tryptophan als N-Quelle verwertet; denn das Kynureninmolekül enthält noch beide N-Atome. Es hat sich die folgende einfache Erklärung dafür finden lassen: Wir hatten zunächst für die Versuche DL-Tryptophan benutzt. Anders fiel das Ergebnis aus, wenn dem Pilz L-Tryptophan geboten wurde. Dann nahm das Tryptophan auch ab, und von der zweiten Abnahme an war auch Kynurenin festzustellen, jedoch in sehr geringer und im weiteren Verlauf der Inkubation wieder abnehmender Menge trotz fast völligen Tryptophanschwundes (Abb. 3). Der Pilz kann also offenbar beide Enantiomere des Tryptophans in Kynurenin umwandeln, weiter abbauen kann er aber nur das aus dem L-Tryptophan entstehende L-Kynurenin, während die unphysiologische Form des Zwischenproduktes, das D-Kynurenin, im Kulturmedium angesammelt wird. Ein mit D-Tryptophan durchgeführter Versuch bestätigte diesen Befund. Hier kam es wieder zu einer Kynureninanhäufung, wenn dem Pilz neben Tryptophan Nitrat zur Verfügung stand, außerdem stellte sich heraus, daß der Pilz mit D-Tryptophan als alleiniger N-Quelle sich nur spärlich entwickelt und aus diesem Grund nur wenig Tryptophan verbraucht und dementsprechend wenig Kynurenin bildet (Abb. 3, Tabelle 1). Es ist bemerkenswert, daß der Pilz auf DL-Tryptophan mindestens ebenso-

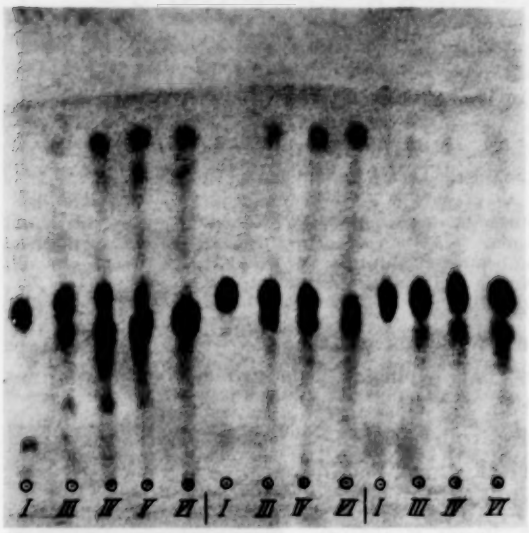



Abb. 3. Abbau von DL-, L- und D-Tryptophan durch *Penicillium notatum*. Ehrlich-Reaktion. Nährsubstrat ohne Nitrat mit je 100 mg Tryptophan. Versuchsdauer 15 Tage. DL-Tryptophan: *I—VI* links; L-Tryptophan: *I—VI* Mitte; D-Tryptophan: *I—VI* rechts

gut wächst wie auf L-Tryptophan. Eine Hemmung durch die unphysiologische D-Komponente, wie sie z.B. für *Agrobacterium tumefaciens* (SMITH et TOWNSEND) CONN beschrieben wird (HODGSON, PETERSON und RIKER 1951), kann also nicht vorliegen.

Bei diesen Untersuchungen haben wir den Befund von MASON und BERG (1952) bestätigen können, daß die Enantiomere des Kynurenins verschieden rasch wandern, und zwar bewegt sich die L-Form etwas rascher als die D-Form. Die Fluorescenzaufnahmen lassen dies bei den Abnahmen 1 und 2 deutlich erkennen. Von der 3. Abnahme an ist der vorauseilende Fleck, das L-Kynurenin, wieder verschwunden (Abb. 2). Auch auf den anderen gutgelungenen Chromatogrammen ist diese Erscheinung festzustellen. Sowohl das aus L- als auch das aus D-Tryptophan entstehende Kynurenin treten als Doppelfleck auf, was entweder auf Verunreinigungen der gebotenen Enantiomere durch die jeweiligen optischen Antipoden oder auf einer Umwandlung von D- und L-Tryptophan oder D- und L-Kynurenin in diese durch den Pilz beruht.

Tabelle 1. *Trockensubstanzproduktion durch Penicillium notatum auf* DL-, L- *und* D-*Tryptophan. Nährsubstrat: Grundlösung mit der halben Nitratmenge und ohne Nitrat mit je 100 mg Tryptophan.* (Versuchsdauer: 15 Tage)

| N-Quelle | mg gebildetes Mycel (Trockensubstanz) |
|---|---|
| DL-Tryptophan + $^1/_2$ Nitrat . . . | 180 |
| L-Tryptophan + $^1/_2$ Nitrat . . . | 135 |
| D-Tryptophan + $^1/_2$ Nitrat . . . | 70 |
| DL-Tryptophan ohne Nitrat . . . | 130 |
| L-Tryptophan ohne Nitrat . . . | 118 |
| D-Tryptophan ohne Nitrat . . . | 15 |

Der Abbau des Tryptophans über das Kynurenin ist bereits bei anderen Objekten nachgewiesen worden. Wie von KOTAKE und IWAO (1931) erkannt und unter anderem von KNOX und MEHLER (1950) und MASON und BERG (1952) näher untersucht wurde, vermag das Säugetier in bestimmten Geweben Tryptophan in Kynurenin umzuwandeln. BUTENANDT und Mitarbeiter (1940) fanden, daß Kynurenin als Intermediärprodukt bei der Bildung der Ommochrome durch Insekten auftritt. Nach BEADLE und Mitarbeitern (s. HOROWITZ) läuft bei *Neurospora* die Bildung der Nicotinsäure aus Tryptophan ebenfalls über das Kynurenin; dasselbe scheint für *Phycomyces* zuzutreffen (SCHOPER und BOSS 1949), und die Vermehrung der Nicotinsäure in keimenden Getreidesamen nach Tryptophan- und Kynureninzusatz (CHITRE, DESAI und RAUT 1955) spricht dafür, daß auch bei der höheren Pflanze Kynurenin als Vorstufe der Nicotinsäure auftritt.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen werden in einer späteren Arbeit eingehend diskutiert.

**Zusammenfassung**

Der Schimmelpilz *Penicillium notatum* und eine Anzahl anderer Pilze bauen die Aminosäure Tryptophan, als alleinige N-Quelle oder zusammen mit Nitrat geboten, ab. Unter den Abbauprodukten wurde die Aminosäure Kynurenin nachgewiesen. Während beim D-Tryptophan der Abbau nur bis zum Kynurenin, offenbar D-Kynurenin, geht, wird das aus L-Tryptophan entstehende Kynurenin weiter zerlegt und der Stickstoff in einer Form freigesetzt, daß der Pilz seinen gesamten N-Bedarf damit decken kann. Außer Kynurenin wurden in Ansätzen mit *Penicillium notatum* Anthranilsäure und Oxyanthranilsäure, in Ansätzen mit anderen Pilzen bis zu acht verschiedene Umwandlungsprodukte des Tryptophans, die mit Ehrlichs Reagens farbige Komplexe bilden, festgestellt.

**Literatur**

Butenandt, A., W. Weidel u. E. Becker: Kynurenin als Augenpigmentbildung auslösendes Agens bei Insekten. Naturwiss. **28**, 63—64 (1940). — Chitre, R. G., D. B. Desai and V. S. Raut: Die Biosynthese der Nicotinsäure in keimenden Getreidesorten und Hülsenfrüchten. Proc. Soc. Biol. Chem., India, **13**, 17—18 (1955). — Hellmann, H.: Papierchromatographische Trennung von Tryptophan, α-Oxytryptophan, Kynurenin und 3-Oxy-Kynurenin. Z. physiol. Chem **287**, 205 (1951). — Hill, E. G., and A. R. Patton: The Maillard-reaction in microbiological assay. Science (Lancaster, Pa.) **105**, 481—482 (1947). — Hodgson, R., W. H. Peterson and A. I. Riker: Inhibition of crowngall bacteria by D-tryptophane and its reversal by an unidentified metabolite. J. Bacter. **62**, 445—459 (1951). — Horowitz, N. H.: Biochemical genetics of Neurospora. Adv. Genet. **3**, 33—71 (1950). — Knox, W. E., and A. H. Mehler: The conversion of tryptophane to kynurenine in liver. I. The coupled tryptophane peroxidase-oxidase system forming formylkynurenine. J. Biol. Chem. **187**, 419—430 (1950). — Kotake, Y., u. I. Iwao: Studien über den intermediären Stoffwechsel des Tryptophans. I. Mitt. Über das Kynurenin, ein intermediäres Stoffwechselprodukt des Tryptophans. Z. physiol. Chem. **195**, 139—147 (1931). — Mason, M., and C. P. Berg: The metabolism of D- and L-tryptophane and D- and L-kynurenine by liver and kidney preparations. J. of Biol. Chem. **195**, 515—524 (1952). — Schoper, W. H., and M. L. Boss: Tryptophane-nicotinic acid relationship. Production of nicotinic acid avitaminosis in organism by vitamin $K_3$ (2 methyl-1,4-naphthoquinone). Helvet. physiol. Acta **7**, C 20—22 (1949). — Wiss, O., u. H. Hellmann: Über die Einführung phenolischer Hydroxylgruppen beim oxydativen Tryptophan-Stoffwechsel. Z. Naturforsch. **8b**, 70—76 (1953).

Dr. P. Schwarze, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln-Vogelsang

Planta, Bd. 50, S. 359—370 (1958)

Aus dem Institut für Forstbotanik, Eberswalde

# ÜBER DEN NACHWEIS VON OXYDASEN UND PEROXYDASEN BEI HÖHEREN PILZEN UND DIE BEDEUTUNG DIESER ENZYME FÜR DIE BAVENDAMM-REAKTION

Von

HORST LYR

Mit 5 Textabbildungen

*(Eingegangen am 31. August 1957)*

Seit den grundlegenden Beobachtungen von BAVENDAMM (1928a) sind oxydierende Fermentsysteme bei höheren Pilzen schon wiederholt untersucht worden, da — zumindest einige von ihnen — mit der Fähigkeit zum Ligninabbau in Verbindung gebracht werden können.

Trotz der vielfachen Anwendung, die die sog. „Bavendamm-Reaktion" für diagnostische Zwecke inzwischen gefunden hat (ROBAK 1942, CARTWRIGHT und FINDLAY 1946, NOBLES 1948 u. a.), ist die Natur der daran beteiligten Enzyme noch nicht endgültig geklärt. Das ist teilweise durch die früher verbreitete Unklarheit über die Abgrenzung der einzelnen Polyphenoloxydasen und teilweise durch die Anwendung unspezifischer Nachweismethoden zu erklären.

Ausgehend von den Beobachtungen BAVENDAMMs (1928a, b), daß gewisse Weißfäuleerreger Tannin und Gallussäure zu dunkel gefärbten Produkten oxydieren, während typische Braunfäuleerreger diese Fähigkeit nicht besitzen, griffen DAVIDSON, CAMPBELL und BLAISDELL (1938) dieses Problem auf und versuchten, an 210 Arten von Holzzerstörern die Beziehung zwischen Bavendamm-Reaktion und der Art des Holzabbaues zu klären. Sie fanden, daß 80% der Braunfäuleerreger eine negative und 96% der Weißfäuleerreger eine positive Reaktion gaben. Dies bedeutet zwar eine positive Korrelation, jedoch stellen die gefundenen Ausnahmen den Wert der Reaktion für den Nachweis des Ligninabbauvermögens noch in Frage.

Es war daher das Ziel eigener Untersuchungen, Testbedingungen zu finden, die es ermöglichen, diese Korrelation schärfer zu fassen und darüber hinaus Aussagen über die beteiligten Enzyme zu machen.

Tannin und Gallussäure sind ebenso wie Brenzcatechin Universalsubstrate, die sowohl von Laccase und Tyrosinase als auch von Peroxydase + Peroxyd oxydiert werden. Die Verwendung dieser Substanzen erlaubt daher keine Unterscheidung zwischen diesen Enzymen, die nach den Untersuchungen von LINDEBERG und FAHRAEUS (1952),

Fahraeus (1952), Boidin (1951), Higuchi (1953b) und Lyr (1956) von höheren Pilzen gebildet werden. Dennoch ist gegen die Verwendung eines Universalsubstrates nichts einzuwenden, wenn es die Feststellung einer klaren Beziehung zwischen positiver Reaktion und der Fähigkeit zum Ligninabbau ermöglicht. Der Angriff auf das Lignin der pflanzlichen Zellwand setzt die Bildung eines Ektoenzyms voraus, das das unlösliche Lignin in eine lösliche Form überführt und damit für den Pilz aufnahmefähig macht. Der einwandfreie Nachweis eines echten Ektoenzyms ist aber nur unter solchen Bedingungen möglich, die dem Pilz ein annähernd normales Wachstum gestatten oder zumindest autolytische Prozesse ausschließen. Hierdurch ist einer der wesentlichsten Einwände gegen die bisherige Handhabung der Bavendamm-Reaktion begründet. Bavendamm entschied sich für einen Gallussäure- bzw. Tanninzusatz zum Nährboden von 0,5%. Diese Konzentration haben die meisten anderen Autoren beibehalten, obwohl sehr viele Pilzarten hierdurch stark gehemmt oder völlig am Wachstum verhindert werden (vgl. Davidson u. Mitarb. sowie Boidin). Bei manchen Arten kann daher der Ausfall der Reaktion nur nach der Verfärbung der Impfstücke beurteilt werden, was sehr problematisch ist. Bei eigenen Versuchen setzte ich daher die Zusätze auf 0,08—0,1% herunter. Dadurch ist für den überwiegenden Teil der Pilze ein annähernd normales Wachstum gesichert. Nur 9% der insgesamt untersuchten 154 Arten waren auch unter diesen Bedingungen nicht zum Wachsen zu bringen, so daß für sie die Konzentration der Zusätze noch weiter herabgesetzt werden mußte.

Diese an sich geringfügige methodische Abwandlung hat auf den Ausfall der Reaktion bei einigen Arten einen deutlichen Einfluß und erscheint mir geeignet, die Beziehung zwischen Bavendamm-Reaktion und Ligninabbau schärfer zu fassen. Die Erklärung hierfür wird im Zusammenhang mit den beteiligten Fermenten gegeben werden.

Von allen Autoren wurden bisher Tannin und Gallussäure als gleichwertige Substrate für die Bavendamm-Reaktion angesehen. Biochemisch trifft das zwar zu, da beide Substanzen in gleicher Weise von den obengenannten Fermenten oxydiert werden. Die physiologische Wirkung dieser beiden Verbindungen ist jedoch unterschiedlich. Wie sich in neueren Versuchen (Lyr 1958) ergeben hat, vermag Tannin bei einigen Pilzarten die Laccase-Bildung in spezifischer Weise zu induzieren, während Gallussäure diese Fähigkeit nicht besitzt. Das ist bei solchen Pilzen von Bedeutung, bei denen die Laccase-Bildung nicht konstitutiv festgelegt ist, sondern erst unter besonderen stoffwechselphysiologischen Bedingungen einsetzt. Ein eindrucksvolles Beispiel hierfür ist *Collybia velutipes* Curt. Dieser Pilz gibt mit Gallussäure eine inkonstante Bavendamm-Reaktion. Diese kann zunächst völlig negativ sein, später nach positiv

umschlagen oder auch negativ bleiben, manchmal auch sofort positiv sein. Mit Tannin hingegen erhält man stets eine klare positive Reaktion. Andere Arten, z.B. *Schizophyllum commune*, verhalten sich ähnlich. Daher ist es angebracht, für die Bavendamm-Reaktion nur Tannin zu verwenden, weil dadurch die Ergebnisse klarer und die Korrelationen mit dem Ligninabbauvermögen deutlicher werden.

Die milchige Trübung des Testagars nach Sterilisation mit Tannin oder Gallussäure ist ebenso wie die herabgesetzte Gelierfähigkeit wahrscheinlich durch eine oxydative Veränderung bedingt und nicht durch eine Säurehydrolyse, wie BAVENDAMM ursprünglich annahm. Die gleichen Effekte kann man durch einen Zusatz von Hydroperoxyd erzielen. Sowohl Tannin als auch Gallussäure bilden bei Autoxydation beträchtliche Mengen an Hydroperoxyd, was sich leicht nachweisen läßt. Durch die Hitzesterilisation wird die Autoxydation zweifellos stark beschleunigt, und entstehendes Hydroperoxyd dürfte den Agar oxydieren, wobei vermutlich Schleimsäure als unlösliches Produkt entsteht, das die milchige Trübung hervorruft.

Bei Verwendung der Bavendamm-Reaktion als Indicator des Ligninabbauvermögens ist es natürlich von Interesse, Aufschluß über die beteiligten Fermente zu erhalten. Da bisher außer Laccase, Tyrosinase und Peroxydase keine anderen Oxydasen mit ähnlichem Wirkungsspektrum bei höheren Pilzen gefunden wurden, kann sich die weitere Besprechung auf diese Fermente beschränken.

Die Cytochrom-c-Oxydase vermag zwar in Gegenwart von Cytochrom c ebenfalls eine Reihe von Polyphenolen zu oxydieren; da sie aber nur intracellulär und streng strukturgebunden auftritt, kann sie hier außer Betracht gelassen werden. Bisher haben sich keine Anhaltspunkte gefunden, daß sie mit Phenolderivaten, die dem Nährboden zugesetzt wurden, in sichtbarer Weise reagiert.

Aus den Untersuchungen verschiedener Autoren [BOIDIN (1951), FAHRAEUS (1952), LINDEBERG und FAHRAEUS (1952), HIGUCHI (1953), HIGUCHI und KITAMURA (1953)], geht hervor, daß *Laccase* von zahlreichen Arten höherer Pilze gebildet und vom Mycel als Ektoenzym ausgeschieden wird. Es besteht daher kein Zweifel, daß dieses Ferment in erster Linie für den positiven Ausfall der Tannin-Reaktion verantwortlich ist. Es bleibt nur zu klären, ob und in welchem Ausmaß sich die beiden anderen Fermente an der Reaktion beteiligen.

HIGUCHI (1953, 1954), HIGUCHI und KITAMURA (1953) nehmen an, daß auch die *Tyrosinase* sich an der Bavendamm-Reaktion beteiligt. Sie konnten bei einigen Pilzarten eine extracelluläre Tyrosinase nachweisen, was im Gegensatz zu den Befunden von LINDEBERG und HOLM (1952) steht. In eigenen Versuchen an 154 Arten holzzerstörender und 28 Arten bodenbewohnender Pilze konnte nur bei 4 Arten eine sehr schwache Tyrosinase-Aktivität im Kulturfiltrat festgestellt werden, obwohl 62 Arten reichlich Tyrosinase im Mycel enthielten. Da das Ferment durch autolytische Prozesse leicht freigesetzt werden kann und solche in den genannten Versuchen nicht völlig auszuschließen waren, möchte ich mich der Meinung von LINDEBERG und HOLM anschließen, die die

Tyrosinase als Endoenzym betrachten. Diese Ansicht findet durch die in Tabelle 2 zusammengestellten Ergebnisse ihre Stütze. Als Endoenzym kann sich nämlich die Tyrosinase nicht an der Bavendamm-Reaktion beteiligen. Der Beweis hierfür läßt sich durch folgenden Versuch erbringen:

*Fistulina hepatica* SCHFF. bildet weder Laccase noch Peroxydase, statt dessen aber reichlich intracelluläre Tyrosinase. Auf Tannin-Malz-

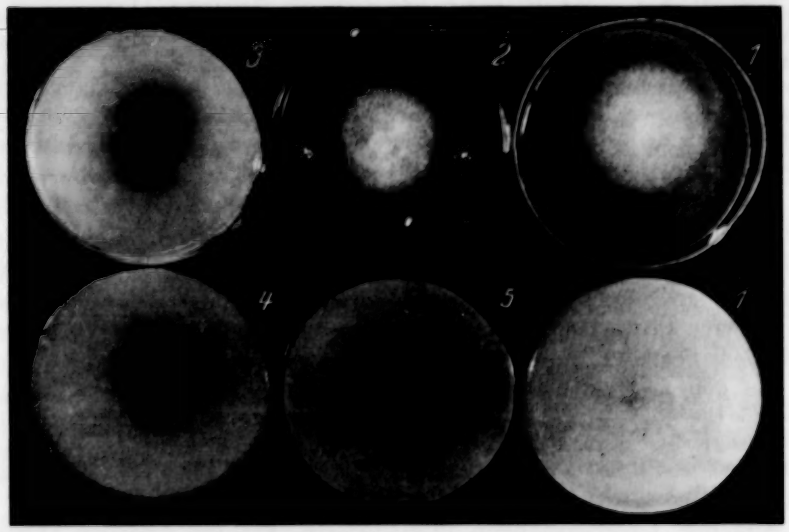



Abb. 1. Bavendamm-Reaktion von Fistulina hepatica. Wachstum auf 3%igem Malz-Agar + 0,1% Tannin. *1* Negative Reaktion bei normalem Wachstum (Ober- und Unterseite der Kultur); *2* Wachstumshemmung durch Pentachlorphenol (keine Reaktion); *3* positive Reaktion nach Behandlung des Mycels mit 0,1%iger $HgCl_2$-Lösung; *4* dito nach Einwirkung von 2,4-Dinitrophenol; *5* dito nach Einwirkung von Toluoldämpfen

Agar (Tanninzusatz 0,1%) erhält man bei annähernd normalem Wachstum eine negative Reaktion, d.h. das Tannin wird nicht oxydiert, obwohl sich mit dem später zu beschreibenden Verfahren die gleichzeitige Anwesenheit von Tyrosinase im Mycel nachweisen läßt. Setzt man jedoch das so gewachsene Mycel dem Einfluß von Giftstoffen aus wie Toluol, Dinitrophenol, Quecksilberchlorid u.a., so erhält man in kurzer Zeit eine positive Bavendamm-Reaktion durch freigesetzte Tyrosinase (Abb.1). Benutzt man höhere Tannin- oder Gallussäurekonzentrationen, dann ist das Anwachsen des Impfstückes zunächst gehemmt, und es setzen autolytische Prozesse ein, die Tyrosinase freisetzen. Daher kann man bei einigen Arten (z.B. *Leptoporus stipticus* PERS., *Lentinus lepideus* BULL., *Phaeolus schweinitzii* PAT.) beobachten, daß das Impfstück zunächst eine positive Reaktion, das ausgewachsene Mycel aber eine negative Bavendamm-Reaktion gibt. Dieser Effekt ist durch autolytisch frei-

gesetzte Tyrosinase bedingt. Daher kann die bräunliche Verfärbung von Impfstücken und selbst eine Hofbildung nicht ohne weiteres als positiver Ausfall der Reaktion gewertet werden. Für eine Feststellung des Ligninabbauvermögens darf nur die Reaktion eines annähernd normal wachsenden Mycels benutzt werden.

Von den 62 Arten, bei denen sich Tyrosinase nachweisen ließ, gaben nur 50 Arten eine positive Tannin-Reaktion, was auf die gleichzeitige Anwesenheit von Laccase zurückzuführen ist. Die Korrelation zwischen positiver Bavendamm-Reaktion und dem Auftreten von Tyrosinase ist wenig ausgeprägt (vgl. Tabelle 2).

Noch nicht völlig geklärt ist die Frage der Beteiligung von *Peroxydase* an der Reaktion. Dieses Ferment, das ein sehr ähnliches Wirkungsspektrum wie Laccase besitzt, wird von einigen Pilzen ebenso wie die Laccase in das Kulturmedium ausgeschieden (Lyr 1956). Da alle Peroxydase bildenden Arten eine kräftige positive Bavendamm-Reaktion geben, lag der Gedanke nahe, daß diese durch Peroxydase + Peroxyd hervorgerufen wird, zumal bei einigen Arten [*Phellinus pini* Pil., *Ph. igniarius* Quél., *Polystictus tomentosus* Karst. u. a. (vgl. Lyr 1956)] mit Hilfe des Benzidin-Testes keine Laccase nachgewiesen werden konnte. Bei einem eingehenderen Studium an Flüssigkeitskulturen zeigte es sich jedoch inzwischen, daß bei allen Peroxydase bildenden Arten auch geringe Laccase-Ausscheidungen festgestellt werden können. Die Laccase-Aktivität ist allerdings bei den bisher als negativ angesehenen Arten so gering, daß sich Benzidin für ihren Nachweis nicht eignet, da dessen Oxydationsprodukte offenbar wieder reversibel reduziert werden. Bessere Resultate brachte die Verwendung von Guajacol, dessen Oxydationsprodukt Tetraguajacol [Formel bei Maehly (1954)] nicht reduzierbar ist. Mit Guajacol konnte bei allen Peroxydase-Bildnern in Malz-Flüssigkeitskulturen eine — allerdings äußerst geringe — Laccase-Aktivität nachgewiesen werden. Da Tannin außerdem eine induzierende Wirkung für Laccase-Bildung besitzt [Lyr (1958)], muß bei allen Peroxydase-Bildnern im Bavendamm-Test mit der gleichzeitigen Anwesenheit von Laccase gerechnet werden. Unter diesen Bedingungen ist es praktisch unmöglich zu entscheiden, ob die Reaktion durch Peroxydase oder durch Laccase hervorgerufen wird. Wie aus Abb. 2 zu ersehen ist, diffundiert die Peroxydase einige Millimeter dem wachsenden Mycel voraus, ohne das α-Naphthol im Nährboden zu oxydieren, was auf die Abwesenheit von Peroxyd zurückzuführen ist. Ein gleiches Verhalten läßt sich auch auf Tannin-Platten nachweisen. Für die Wirksamkeit des Fermentes ist unter diesen Bedingungen die Bildung von Peroxyd der begrenzende Faktor. Ob und in welchem Ausmaß dieses vom Pilz gebildet wird, konnte bisher noch nicht ermittelt werden.

Zum Abschluß ist es noch notwendig, auf die Enzymnachweisverfahren einzugehen, die für diese Untersuchungen benutzt wurden, da die bisher verwendeten Methoden mit einer Reihe von Mängeln behaftet sind, die eine Verbesserung der Nachweisverfahren wünschenswert machen.

Um zu Aussagen über die an der Bavendamm-Reaktion beteiligten Enzyme zu gelangen, schlugen bereits BOIDIN und HIGUCHI die Verwendung von Spezialnährböden vor. Die Verfahren beruhen auf einer Anwendung von Substanzen, die eine Trennung der Laccase- und der

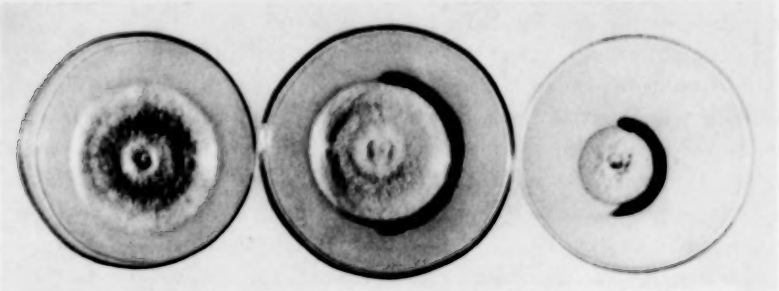


Abb. 2. Nachweis der Peroxydase-Ausscheidung bei Phellinus igniarius und Ph. pini auf α-Naphthol-Malz-Agar. Links: Ph. igniarius auf α-Naphthol-Agar. Mitte: dito jedoch Benzidinlösung auf die Platte aufgetragen und halbseitig $H_2O_2$ zugesetzt. Rechts: Ph. pini wie mittlere Schale behandelt

Tyrosinase-Aktivität ermöglichen. Tabelle 1 soll an einigen ausgewählten Substanzen die Spezifität der einzelnen Enzyme veranschaulichen.

Aus der Übersicht ist zu entnehmen, daß Tannin und Gallussäure als Universalsubstrate für eine Differenzierung der Enzyme ungeeignet

Tabelle 1. *Substratspezifität von Laccase, Tyrosinase und Peroxydase, dargestellt an einigen ausgewählten Substanzen.*
(Farbe der Oxydationsprodukte in Klammern gesetzt)

| Substrat | Laccase | Tyrosinase | Peroxydase (+ Peroxyd) |
|---|---|---|---|
| α-Naphthol . . . . . | + (blau) | 0 | + (blau) |
| Guajacol . . . . . | + (rotbraun) | 0 | + (rotbraun) |
| p-Kresol. . . . . | + (weiß) | + (braun) | + (weiß) |
| p-Kresol + Glykokoll . . | + (weiß) | + (rot) | + (weiß) |
| Benzidin . . . . . | + (blau) | 0 | + (blau) |
| Tyrosin . . . . . | 0 | + (rotbraun) | 0 |
| Gallussäure . . . . . | + (braun) | + (braun) | + (braun) |
| Tannin . . . . . | + (braun) | + (braun) | + (braun) |

sind. Laccase und Peroxydase sind in Gegenwart von Hydroperoxyd mit Hilfe oben angeführter Reaktionen nicht zu unterscheiden, wenn man gezwungen ist, mit lebenden Organismen unter physiologischen Bedingungen zu arbeiten. In Abwesenheit von Peroxyd ist dagegen eine

Unterscheidung möglich. Für die Differenzierung von Laccase und Tyrosinase gibt es mehrere Möglichkeiten, deren Ausnutzung für einen leicht und einwandfrei zu handhabenden Test allerdings durch verschiedene Überlegungen eingeschränkt wird.

Für den Laccase-Nachweis setzte BOIDIN dem Nährboden 0,2% Guajacol (=0,016 mol) zu, während HIGUCHI für den gleichen Zweck einen α-Naphthol-Zusatz von 0,072% (=0,005 mol) verwandte. Unter der Einwirkung der vom Mycel ausgeschiedenen Laccase verfärbt sich dann der Nährboden rotbraun bzw. blau. Diese Farben sind so kräftig, daß sie eine Auswertung ohne Mühe gestatten. Nach meinen Erfahrungen sind jedoch die Konzentrationen der Zusätze zu hoch, so daß nur bei einigen Arten auf diese Weise ein normales Wachstum auf den Testplatten erzielt werden kann. Es empfiehlt sich daher, nur 0,005% α-Naphthol oder Guajacol zuzusetzen, was für die meisten Pilze kaum mehr toxisch ist.

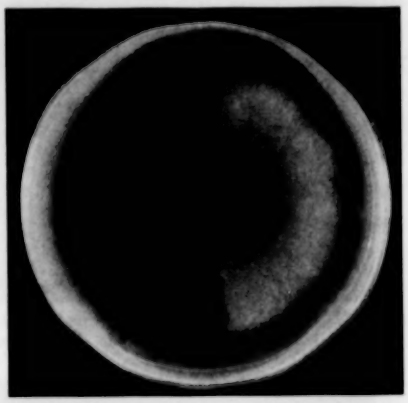


Abb. 3. Laccase-Nachweis mit Benzidin bei Panus stipticus. Benzidinlösung halbseitig auf die Unterseite der Kultur aufgetragen

Diese Testnährböden können für einen Laccase-Nachweis sehr nützlich sein, sie erlauben jedoch keine Unterscheidung von Laccase und Peroxydase, weshalb lange Zeit das Vorkommen von Peroxydase bei höheren Pilzen übersehen wurde.

Für einen getrennten Nachweis dieser beiden Enzyme und zugleich für eine präzisere Lokalisation ihres Auftretens hat sich folgendes Verfahren gut bewährt:

Die Mycelien werden auf Malz-Agar in Petri-Schalen kultiviert, was den Vorteil hat, daß ein völlig normales Wachstum gewährleistet ist. Für den Enzymnachweis wird die Agar-Platte vorsichtig aus der Schale herausgehoben und auf die Unterseite des Mycels eine 0,1%ige Lösung von Benzidin in Acetatpuffer von $p_H$ 4,4 aufgetragen. Bei Anwesenheit von Laccase verfärbt sich der Agar innerhalb weniger Minuten intensiv blau (Abb. 3). Bei den meisten Arten läßt sich das Enzym im gesamten Mycelbereich und darüber hinaus in einer mehr oder weniger breiten Diffusionszone nachweisen. Bei *Ustulina vulgaris* TUL. hingegen nimmt die Laccase eine ringförmige Zone ein, dadurch, daß sie nur im Bereich der Hyphenspitzen der Mycelfront in aktiver Form nachweisbar ist (Abb. 4). Auf diese Weise lassen sich bei einigen Pilzen charakteristische Eigentümlichkeiten der Fermentausscheidung erkennen.

In Gegenwart von Peroxydase tritt eine Blaufärbung nur ein, wenn gleichzeitig mit dem Benzidin Hydroperoxyd zugesetzt wird (Abb. 5). In Gegenwart von Laccase deutet eine Verstärkung der Farbintensität durch Zusatz von Hydroperoxyd auf die Anwesenheit von Peroxydase hin. Ihr Nachweis ist allerdings bei gleichzeitiger Gegenwart sehr aktiver

Abb. 4. Laccase-Nachweis mit Benzidin bei Ustulina vulgaris auf Malz-Agar. *2* Normale Kultur (Oberseite) ohne Zusatz; *3* Unterseite der Kultur mit Benzidinlösung behandelt

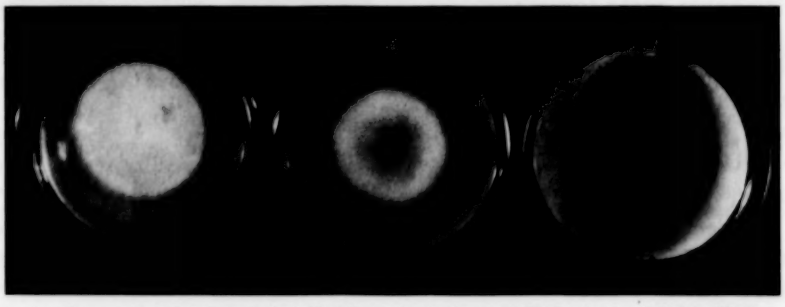


Abb. 5. Peroxydase-Nachweis bei Phellinus igniarius auf Malz-Agar. Links: Unterseite der Kultur, unbehandelt. Mitte: Benzidin auf die Unterseite der Kultur aufgetragen. Rechts: dito + Hydroperoxyd

Laccase problematisch und nur in Abwesenheit von Sauerstoff einwandfrei durchführbar. Nach den bisherigen Untersuchungsergebnissen scheiden aber die typischen Peroxydase-Bildner nur geringe Mengen an Laccase aus, die den Peroxydase-Nachweis nicht stören. Die Verwendung des Benzidin-Testes wird nur eingeschränkt durch die Unempfindlichkeit gegenüber äußerst geringen Laccase-Aktivitäten, was — wie bereits erwähnt — mit der Reduzierbarkeit der Oxydationsprodukte zusammenhängt.

Wesentlich problematischer als der Nachweis von Laccase ist der Tyrosinase-Nachweis mittels des Testplatten-Verfahrens. BOIDIN setzte

dem Agar 0,2% Tyrosin oder p-Kresol zu. Bei 40 Arten ergab der Tyrosin-Zusatz eine deutlich positive Reaktion, während bei einer Reihe von weiteren Arten der Fermentnachweis wegen der nur schwachen Verfärbung unsicher blieb. Etwas günstigere Ergebnisse wurden mit p-Kresol erzielt. Da ein Zusatz von 0,2% bereits stark toxisch wirkt, kann nur der Tyrosinase-Gehalt des Impfstückes getestet werden, wobei dessen Alter berücksichtigt werden muß. Außerdem geben sowohl Tyrosin als auch p-Kresol rötlichbraune Oxydationsfarben, die bei manchen Arten nicht von der normalen Verfärbung des Nährbodens durch den Pilz zu unterscheiden sind. Dadurch wird der Fermentnachweis unsicher. Hinzu kommt, daß die Tyrosinase-Ausscheidung durch das Impfstück einem pathologischen Prozeß entspricht und daraus keine Rückschlüsse auf das Vorkommen des Fermentes in einem normal wachsenden Mycel gezogen werden können. Setzt man die p-Kresol-Konzentration auf 0,01% herab, so kann man bei der Mehrzahl der Pilze ein annähernd normales Wachstum erreichen. Dann zeigt sich, daß zwar das Impfstück zunächst eine Braunfärbung gibt, das auswachsende Mycel aber keine Reaktion erkennen läßt. Dieses Verhalten ist durch die intracelluläre Lokalisation der Tyrosinase verständlich, worauf bereits hingewiesen wurde.

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, benutzte ich ein Verfahren, das einen sehr empfindlichen Tyrosinase-Nachweis an normal gewachsenen Kulturen erlaubt. Das Mycel wird auf Malz-Agar kultiviert und bei hinreichender Größe des Pilzgeflechtes eine Lösung von $10^{-2}$ mol p-Kresol + 0,05% Glykokoll aufgetragen. Unter der Einwirkung dieses Reagens, das von CHODAT (1936) beschrieben wurde, wird die im Mycel vorhandene Tyrosinase freigesetzt und bewirkt eine mehr oder weniger intensive Verfärbung der Testlösung, die von Gelb über Orange zu einem kräftigen Rot führt. Die erhaltene Farbe ist sehr stabil und über Wochen haltbar. Sie kann mit der Eigenfarbe der Mycelien kaum verwechselt werden; es sei denn, daß selbst nach 24 Std nur ein leicht gelblicher Farbton erzielt wird, der bei bräunlich gefärbten Mycelien nicht als positiver Ausfall der Reaktion gewertet werden kann. Laccase und Peroxydase stören den Nachweis nicht, da sie p-Kresol zu milchigweißen Produkten oxydieren. Die Reaktion ist geeignet, Tyrosinase in normal gewachsenen Mycelien nachzuweisen, was gegenüber den bisherigen Verfahren einen wesentlichen Fortschritt bedeutet.

Zur Veranschaulichung der bisherigen Ausführungen sollen in einer tabellarischen Übersicht Holzzersetzungstyp, Bavendamm-Reaktion und Enzymbildung von einigen Pilzen einander gegenübergestellt werden (Tabelle 2). Eine umfassendere Darstellung dieser Eigenschaften für diagnostische Zwecke ist zu einem späteren Zeitpunkt vorgesehen. An Holzzersetzungstypen wurden nur Weißfäule (W) und Braunfäule(B)

Tabelle 2. *Gegenüberstellung von Holzzersetzungstyp, Bavendamm-Reaktion und Enzymbildung bei einigen holzzerstörenden Pilzen*

| Pilz | Zersetzungstyp | Reaktion auf 0,1 % | | Laccase | Peroxydase | Tyrosinase |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Gallussäure | Tannin | | | |
| *Anisomyces odoratus* (W.) PILAT | B | 0 | 0 | 0 | 0 | ++ |
| *Armillaria mellea* VAHL. | W | +++ | +++ | (+) | + | + |
| *Cereomyces albus* MICH. | B | 0 | 0 | 0 | 0 | ++ |
| *Collybia mucida* SCHRAD. | W | +++ | +++ | ++ | 0 | ++ |
| *Collybia velutipes* CURT. | W | 0–++ | ++ | (++) | 0 | 0 |
| *Coniophora cerebella* ALB. et SCHW. | B | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Fistulina hepatica* SCHFF. | B | 0 | 0 | 0 | 0 | +++ |
| *Fomes annosus* COOKE | W | +++ | +++ | +++ | 0 | 0 |
| *Fomes marginatus* (FR.) GILL. | B | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Ganoderma applanatum* PAT. | W | ++ | ++ | ++ | 0 | 0 |
| *Ganoderma lucidum* KARST. | W | + | ++ | + | ++ | 0 |
| *Gloeophyllum abietinum* KARST. | B | 0 | 0 | 0 | 0 | + |
| *Gloeophyllum saepiarium* KARST. | B | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Gloeoporus adustus* PILAT | W | + | + | (+) | + | + |
| *Grifola frondosa* GRAY | W | (+) | +++ | (+) | 0 | 0 |
| *Grifola gigantea* PILAT | W | ++ | ++ | ++ | 0 | ++ |
| *Grifola sulphurea* PILAT | B | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Inonotus hispidus* KARST. | W | +++ | +++ | (+) | ++ | ++ |
| *Inonotus radiatus* KARST. | W | +++ | +++ | + | +++ | ++ |
| *Lentinus lepideus* BULL. | B | 0 | 0 | 0 | 0 | ++ |
| *Lentinus tigrinus* BULL. | W | ++ | ++ | + | + | 0 |
| *Leptoporus stipticus* PERS. | B | 0 | 0–(+) | 0 | 0 | + |
| *Merulius lacrimans* WULF. | B | 0 | 0 | 0 | 0 | + |
| *Merulius tremellosus* FR. | W | ++ | ++ | ++ | 0 | + |
| *Nematoloma fasciculare* HUDS. | W | ++ | ++ | ++ | 0 | ++ |
| *Nematoloma sublateritium* FR. | W | ++ | ++ | (+) | ++ | +++ |
| *Panus stipticus* BULL. | W | ++ | ++ | ++ | 0 | (+) |
| *Phaeolus schweinitzii* PAT. | B | (+) | (+) | 0 | 0 | ++ |
| *Phellinus igniarius* QUEL. | W | ++ | ++ | (+) | +++ | 0? |
| *Phellinus pini* PILAT | W | ++ | +++ | (+) | ++ | (+) |
| *Phellinus robustus* B. et G. | W | ++ | +++ | + | +++ | 0 |
| *Pholiota mutabilis* SCHAEFF. | W | ++ | +++ | ++ | 0 | ++ |
| *Pholiota squarrosa* QUEL. | W | ++ | +++ | ++ | 0 | +++ |
| *Piptoporus betulinus* KARST. | B | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Pleurotus ostreatus* JACQ. | W | +++ | +++ | +++ | 0 | (+) |
| *Polyporellus arcularius* PILAT | W | +++ | +++ | + | 0 | 0 |
| *Sparassis crispa* WULF. | B | 0 | – | 0 | 0 | 0 |
| *Schizophyllum commune* FR. | W | 0–++ | +++ | (++) | 0 | 0 |
| *Stereum hirsutum* WILLD. | W | ++ | +++ | (+) | 0 | + |
| *Trametes abietina* PILAT | W | ++ | ++ | ++ | 0 | 0 |
| *Trametes betulina* PILAT | W | ++ | ++ | ++ | 0 | 0 |
| *Trametes cinnabarina* JACQ. | W | +++ | ++ | +++ | 0 | 0 |
| *Trametes hirsuta* PILAT | W | ++ | ++ | + | 0 | 0 |
| *Trametes gibbosa* PERS. | W | ++ | ++ | ++ | 0 | 0 |
| *Trametes unicolor* COOKE | W | ++ | ++ | ++ | 0 | (+) |
| *Trametes versicolor* PILAT | W | ++ | ++ | ++ | 0 | 0 |
| *Trametes zonata* PILAT | W | ++ | ++ | ++ | 0 | 0 |
| *Ustulina vulgaris* TUL. | W | ++ | ++ | ++ | 0 | 0 |

unterschieden. Die Stärke der Reaktionen ist gutachtlich in einer Skala von 0 — +++ angegeben. In Klammern gesetzte Angaben bedeuten

einen sehr schwachen oder inkonstanten Ausfall der Reaktion, was besonders bei Laccase häufiger vorkommt, da deren Bildung bei einigen Arten unter besonderen Bedingungen induziert werden kann. Die Enzymteste wurden nach den geschilderten Methoden auf Malz-Agar vorgenommen.

Aus der Übersicht ist deutlich zu erkennen, daß das Vorkommen von Tyrosinase weder eine Beziehung zum Zersetzungstyp noch zu der Bavendamm-Reaktion zeigt. Tyrosinase kommt sowohl bei Weiß- als auch bei Braunfäuleerregern vor und kann nicht für den positiven Ausfall der Bavendamm-Reaktion verantwortlich gemacht werden. Auch dürfte sie für den Ligninabbau nicht von unmittelbarer Bedeutung sein.

Dagegen zeigen Laccase und Peroxydase eine klare Korrelation mit dem positiven Ausfall der Bavendamm-Reaktion, der in erster Linie durch Laccase bedingt ist.

Es ist auffallend, daß alle Weißfäuleerreger über mindestens eines dieser beiden Fermente verfügen. Dadurch ist es sehr wahrscheinlich, daß sich diese Enzyme in irgendeiner Form am Ligninabbau beteiligen, wenngleich die direkte Oxydation des Lignins durch Laccase nach Higuchi, Kawamura und Hayashi (1956) als nicht gesichert angesehen werden muß, was auch mit eigenen Befunden übereinstimmt.

## Zusammenfassung

1. Es wird vorgeschlagen, die Bedingungen der Bavendamm-Reaktion abzuändern und einen Zusatz von 0,08—0,1% Tannin zu verwenden, weil dadurch den meisten Pilzen ein normales Wachstum ermöglicht wird, was für die Auswertung der Reaktion von wesentlicher Bedeutung ist.

2. Tannin und Gallussäure sind nicht als physiologisch gleichwertig anzusehen. Da Tannin konstantere Ergebnisse gibt, wird seine ausschließliche Verwendung vorgeschlagen.

3. Für Laccase, Peroxydase und Tyrosinase werden Testverfahren beschrieben, die einen differenzierten Nachweis dieser Enzyme an normal gewachsenen Mycelien gestatten.

4. Tyrosinase tritt bei den höheren Pilzen als Endoenzym auf und ist nicht für den positiven Ausfall der Bavendamm-Reaktion verantwortlich. Das Enzym kommt sowohl bei Weiß- wie bei Braunfäuleerregern vor und kann nicht mit dem Ligninabbauvermögen in Zusammenhang gebracht werden.

5. Die positive Bavendamm-Reaktion wird fast ausschließlich durch Laccase hervorgerufen. Eine Beteiligung der Peroxydase ist zwar möglich, ließ sich aber bisher aus methodischen Gründen noch nicht nachweisen. Beide Enzyme kommen nur bei Pilzarten vor, die die Fähigkeit zum Ligninabbau besitzen.

## Literatur

Bavendamm, W.: Über das Vorkommen und den Nachweis von Oxydasen bei holzzerstörenden Pilzen. Z. Pflanzenkrkh. **38**, 257 (1928a). — Neue Untersuchungen über die Lebensbedingungen holzzerstörender Pilze. II. Mitt. Gerbstoffversuche. Zbl. Bakter. II **76**, 172 (1928b). — Boidin, J.: Recherche de la Tyrosinase et de la Laccase chez les Basidiomycètes en culture pure. Milieux différentiels. Intérêt systématique. Revue Mycol. **16**, 173 (1951). — Cartwright, K. St. G., and W. P. K. Findlay: Principal decays of British hardwoods. Ann. Appl. Biol. **29**, 219 (1942). — Chodat, R.: Darstellung und Nachweis von Oxydasen und Katalasen pflanzlicher und tierischer Herkunft. Methoden ihrer Anwendung. In Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. IV, Teil 1, S. 319. 1936. — Davidson, R. W., W. A. Campbell and D. J. Blaisdell: Differentiation of wood-decaying fungi by their reactions on gallic or tannic acid medium. J. Agricult. Res. **57**, 683 (1938). — Fahraeus, G.: Formation of laccase by Polyporus versicolor in different culture media. Physiol. Plantarum (Copenh.) **5**, 284 (1952). — Higuchi, T.: Biochemical study of wood-rotting fungi. I. Studies on the enzymes which cause Bavendamms reaction. J. Japan. Forestry Soc. **35**, 1 (1953). — III. In vitro experiment of Bavendamms reaction by using α-naphthol reagent. J. Japan. Forestry Soc. **36**, 22 (1954). — V. The enzymatic oxidation of lignin. J. Japan Wood Res. Soc. **2**, 31 (1956). — Higuchi, T., and K. Kitamura: Biochemical study of wood-rotting fungi (II) Relation between Bavendamms reaction and tyrosinase. J. Japan. Forestry Soc. **35**, 350 (1953). — Lindeberg, G., and G. Fahraeus: Nature and formation of phenol oxidases in Polyporus zonatus and P. versicolor. Physiol. Plantarum (Copenh.) **5**, 277 (1952). — Lyr, H.: Untersuchungen über die Peroxydasen höherer Pilze. Planta (Berl.) **48**, 239 (1956). — Die Induktion der Laccase-Bildung bei Collybia velutipes Curt. Arch. Mikrobiol. im Druck (1958). — Maehly, A. C.: The assay of catalases and peroxidases I. General assay methods. In: Methods of Biochem. Analysis edit. by D. Glick. New York: Intersc. Publ. Inc. 1954. — Nobles, M. K.: Studies in forest pathology. VI. Canad. J. Res., Sect. C **26**, 281 (1948). — Robak, H.: Cultural studies in some Norwegian wood-destroying fungi. A biological study and contribution to diagnostics of wood decay. Medd. Vestlandets Forstl. Forsøksst. Bergen **25** (1942).

Dr. habil. Horst Lyr,
Institut für Forstbotanik der Humboldt-Universität Berlin,
Eberswalde, Schicklerstr. 5

Planta, Bd. 50, S. 371—378 (1958)

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg (Direktor: Prof. Dr. R. Siegert)

# UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE NATUR DER „PHYTAGGLUTININE" IN CHEMISCHER, IMMUNOCHEMISCHER UND PFLANZENPHYSIOLOGISCHER SICHT*

I. Mitteilung

## ANATOMISCHE STUDIEN ÜBER DEN ORT IHRES VORKOMMENS IN HÖHEREN SAMENPFLANZEN**

Von

Martin Krüpe und Albrecht Ensgraber

*(Eingegangen am 17. September 1957)*

Als „Phytagglutinine" bezeichnet man seit 1898[1] bestimmte pflanzliche Eiweißkörper vom Globulintyp, welche mit verdünnten Salzlösungen leicht extrahierbar sind und suspendierte rote Blutzellen zu agglutinieren vermögen.

Altbekannt sind „Ricin" aus Samen von *Ricinus communis*, „Abrin" aus Samen von *Abrus praecatorius* und „Crotin" aus Samen von *Croton Tiglium*. Nach neueren Untersuchungen ist das Hämagglutinationsvermögen auf Affinitäten dieser pflanzlichen Globuline zu distinkten Poly- bzw. Monosacchariden an der Blutzellenoberfläche zurückzuführen. Seit 1948[4] kennt man Phytagglutinine, die wegen ihrer unterschiedlichen Reaktionsfähigkeit mit den gelösten Polysacchariden der AB 0-Blutgruppensubstanzen bzw. mit den in ihnen enthaltenen einfachen Zuckern (D-Galaktose, L-Fukose, N-Acetyl-D-Glucosamin und N-Acetyl-D-Galaktosamin) in zunehmendem Maße zur Blutgruppenbestimmung herangezogen werden. Das aus *Taxus cuspidata* von G. F. Springer[5] isolierte Polysaccharid, welches immunochemisch dem menschlichen Blutgruppenpolysaccharid verwandt ist, reagiert ebenfalls mit „blutgruppenspezifischen" Phytagglutininen. Solche sind bisher bei *Samenpflanzen* hauptsächlich in der Familie der Papilionaceen, weniger bei Celastraceen, Vitaceen und Solanaceen, und zwar vorwiegend in den Samen, bei den höheren *Pilzen* nur unter den Agaricaceen, z. B. *Marasmius oreades*, *Hygrophorus hypothejus*, *Psilocybe spadicea* gefunden worden. Im Jahre 1956 hat der eine von uns[2] eine Monographie über das gesamte, seit 1888[6] bearbeitete Gebiet und im Frühjahr 1957 O. Mäkelä[3] eine zusammenfassende Darstellung über die Hämagglutinine in Leguminosensamen veröffentlicht. Auf beide sei wegen der ausführlichen Literatur hingewiesen.

Die bisherigen Angaben über das Vorkommen der Agglutinine innerhalb der einzelnen, anatomisch gekennzeichneten Pflanzenteile, insbesondere bei den Leguminosensamen, sind ungenau, z. T. nur summarisch

* Herrn Prof. Dr. Hans Schmidt in Verehrung zum 75. Geburtstag.

** Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

und auch häufig widersprechend. Neben den Agglutininen in Samen haben einige Autoren solche in Stengeln, Blättern und Wurzeln beschrieben; andere Untersucher wiederum konnten außerhalb der Samen in den übrigen Pflanzenteilen keine Agglutinine finden. Letzthin berichteten TIGGELMAN-VAN KRUGTEN und Mitarbeiter[7], daß sie bei ihren Untersuchungen an 313 Pflanzenextrakten in den meisten Fällen Agglutinine in den Blättern nachgewiesen hätten, darunter sogar viele, welche kochbeständig waren und selektiv Blutzellen verschiedener Tierarten zusammenballten.

Bei dieser unklaren Sachlage und auch deshalb, weil man bisher die Samen schlechthin als Hauptlokalisationsort der Phytagglutinine betrachtet, hielten wir eingehendere pflanzenanatomische Untersuchungen für notwendig. Auch sind Pflanzenteile mit stark angereicherten Phytagglutininen besser als Ausgangsmaterial für die Reindarstellung dieser Globuline geeignet als solche Teile, in denen die Agglutinine nur in geringer Menge, mit anderen heterogenen Stoffen durchsetzt, vorhanden sind. Bei unseren bereits angelaufenen strukturanalytischen Untersuchungen der Phytagglutinine ist der Reinheitsgrad der Präparate von ausschlaggebender Wichtigkeit.

## Material und Untersuchungstechnik

*1. Pflanzen.* Wir beschränkten uns zunächst auf einige der bekannten Samenpflanzen mit blutgruppenspezifischen Hämagglutininen, über deren serologische Besonderheiten im hiesigen Fuldaer Laboratorium seit 1949 ausreichende Erfahrungen gesammelt wurden. Folgende Blutgruppenagglutinin-Pflanzen wurden untersucht:

a) Anti-H *-Pflanzen: *Laburnum alpinum, Laburnum vulgare, Cytisus praecox, C. supinus, Lotus tetragonolobus, Virgilia lutea.*

b) Anti-A-Pflanzen: *Phaseolus lunatus, Vicia cracca, Dolichos biflorus.*

c) Anti-B + A-Pflanzen: *Sophora japonica, Coronilla varia.*

d) Anti-B + H-Pflanzen: *Evonymus europaea, E. latifolia.*

Als Vertreter der „unspezifischen" Agglutinin-Pflanzen wählten wir: *Robinia pseudoacacia* und als Vertreter der elektiv Kaninchenblutzellen erfassenden Agglutinin-Pflanzen: *Glycine soja.*

Die *Samen* präparierten wir sorgfältig in Schalen, Keimblätter (gegebenenfalls auch Endosperm und Arillus) und Keimwürzelchen, wobei gelegentlich mit dem Lupenmikroskop gearbeitet werden mußte. Die *vegetativen* Pflanzenteile zerlegten wir in Blattspreiten, Rinden- bzw. Stengelmaterial (bei Baumsträuchern getrennt nach Alter und bei einjährigen Pflanzen nach Höhe) sowie Wurzelmaterial. Diese Präparate wurden dann im Mörser mit Quarzsand fein zerrieben und mit 0,85% Kochsalzlösung im Gewichtsverhältnis 1:20 zur Extraktion angesetzt. Nach einer Extraktionszeit von 10—18 Std bei 18—25° C zentrifugierten wir diese Macerationen scharf und verwendeten die überstehenden, mehr oder weniger klaren, z.T.

* H = Blutgruppenantigen (Polysaccharid), welches am meisten bei der menschlichen Blutgruppe 0 und $A_2$, weniger bei B, $A_2B$, $A_1$ sowie $A_1B$, ferner auch bei Tieren, z. B. bei bestimmten Schweinen und Pferden in der Magenschleimhaut, vorkommt.

opalescierenden, z.T. grünlich oder bräunlich gefärbten Flüssigkeiten nach Dekantieren für die Agglutinationsversuche.

*2. Blutzellensuspensionen.* Menschliche rote Blutzellen der Gruppen $A_1$, $A_2$, B und 0 sowie gelegentlich auch Kaninchenblutzellen wurden als 2—3%ige Aufschwemmungen in 0,85% Kochsalzlösung benutzt, wie es bei den Blutgruppenbestimmungen allgemein üblich ist.

*3. Agglutinationsprüfungen.* Die Pflanzenextrakte mischten wir mit den Blutzellensuspensionen entweder als Tropfen auf der Porzellanplatte oder in Mengen von je 0,1 ml im Röhrchen. Nach gutem Durchmischen wurden die Agglutinationsergebnisse auf der Porzellanplatte nach 10 min, im Röhrchen ebenfalls nach 10 min und anschließendem, kurzfristigen Zentrifugieren makroskopisch abgelesen.

Fast mit allen Extrakten stellten wir auch einen quantitativen Test an, und zwar in der Weise, daß der Endpunkt der Agglutination in einer Extraktverdünnungsreihe (= „Titer") ermittelt wurde.

## Ergebnisse

*1. Samen.* Bei keiner Pflanze fanden wir Agglutinine in den Schalen und — soweit vorhanden — im Endosperm (z. B. *Sophora japonica* und *Evonymus europaea*, *E. latifolia*). Keimblätter und Keimwürzelchen zeigten ein eigenartig wechselndes Verhalten.

Bei den meisten Leguminosen waren die Agglutinine hauptsächlich in den Kotyledonen lokalisiert. *Phaseolus lunatus* hatte seine Anti-A-Agglutinine fast gleichmäßig auf Kotyledonen und Radicula verteilt. *Robinia pseudacacia* verhielt sich in dieser Beziehung ähnlich. Eine bemerkenswerte Ausnahme zeigten die Samen von *Laburnum alpinum*. Hier waren die Agglutinine außerordentlich stark in den Keimwürzelchen konzentriert, während die Keimblätter fast leer waren. Dieser Befund war für uns sehr überraschend, da wir bisher immer nur schwach aktive Extrakte erzielt hatten. Nun hatten wir einen sehr stark aktiven Anti-H-Extrakt wie nie zuvor in Händen mit einem Titer von 1:1000 gegen 0-Blutzellen. Eine Ausdehnung dieser Untersuchungen auf die übrigen anti-H-haltigen Vertreter der Genisteae (*Laburnum*, *Cytisus*, *Genista*, *Ulex*) ist einstweilen noch nicht unternommen worden, da Schwierigkeiten bei der Präparation der vorhandenen, stark getrockneten alten Samen bestanden. Die Keimblätter und Keimwürzelchen von *Evonymus europaea* und *E. latifolia* waren agglutinfrei; nur der Arillus erwies sich als agglutininhaltig, womit die früheren Angaben[2] bestätigt werden.

Als weitere Besonderheit fiel bei den Samenuntersuchungen auf, daß sich die „kompletten"* oder „Salzagglutinine" in anderen Samenteilen befinden können als die „inkompletten"* oder „Albuminagglutinine".

* Mit „komplett" bezeichnet man in der Serologie Agglutinine, welche im Elektrolytmilieu von 0,85% NaCl sichtbare Agglutination verursachen, mit „inkomplett" solche Agglutinine, die zwar in dem Elektrolytmilieu eine Bindung mit den Zellen eingehen, aber keine sichtbare Agglutination hervorrufen. Erst ein Reaktionsmilieu wie Albumin, Dextran usw. führt zur Agglutination.

Tabelle 1. *Agglutinationsergebnisse mit Extrakten aus Pflanzenteilen*

| Nr. | Name der Pflanzen | Blutzellen | Samen | | | Vegetative Pflanzenteile | | | | | | Wurzelstücke in toto |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | in toto | Kotyledones | Radiculae | Blätter | Rinde 1957 | Rinde 1955 | Rinde 1952 | Rinde basal | Rinde apikal | |
| 1 | Laburnum alpinum | $A_1$ | — | —, (—) | **16** | —, (—) | — | — | — | | | |
| | | $A_2$ | 8 | **2, (8)** | **512** | —, (—) | **128** | **128** | **256** | | | |
| | | B | 2 | **—, (4)** | **64** | —, (—) | **64** | **64** | **128** | | | |
| | | 0 | 16 | **4, (8)** | **1024** | —, (—) | **128** | **128** | **256** | | | |
| 2 | Laburnum vulgare | 0 | 1 | —, (—) | 8 | | | | | | | |
| 3 | Cytisus praecox | 0 | 8 | | | | 8 | | | | | |
| 4 | Cytisus supinus | 0 | — | | | | 64, (128) | | | | | |
| 5 | Lotus tetragonolobus | $A_1$ | — | — | — | —, (—) | | | | —, (—) | —, (—) | —, (—) |
| | | $A_2$ | 16 | 16 | 4 | | | | | | | |
| | | B | 4 | — | — | | | | | | | |
| | | 0 | 32 | 16 | 8 | | | | | | | |
| 6 | Virgilia lutea | 0 | 4 | 2, (128) | —, (—) | | | | | | | |
| 7 | Phaseolus lunatus | $A_1$ | 32 | 256, (512) | 64, (128) | | | | | | | |
| 8 | Vicia cracca | $A_1$ | 2048 | | | —, (—) | | | | —, (128) | —, (—) | 2048 |
| | | $A_2$ | 1024 | | | | | | | | | 128 |
| | | B | 8 | | | | | | | | | — |
| | | 0 | 8 | | | | | | | | | — |

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 9 | Dolichos biflorus | $A_1$ | 16 | 4, (64) | —, (—) | | | | | | | |
| | | $A_2$ | 1 | —, (2) | —, (—) | | | | | | | |
| 10 | Sophora japonica | $A_1$ | (32) | 128 | —, (32) | | 8 | 128 | | | | |
| | | $A_2$ | (2) | — | —, (2) | | 8 | 8 | | | | |
| | | B | (128) | 512 | —, (128) | | 32 | 512 | | | | |
| | | 0 | (1) | — | —, (—) | | 8 | 2 | | | | |
| 11 | Coronilla varia | $A_1$ | | 32, (64) | —, (32) | | | | | | | |
| | | $A_2$ | | —, (2) | —, (2) | | | | | | | |
| | | B | | 128, (128) | —, (128) | —, (—) | | | | —, (—) | —, (—) | —, (—) |
| | | 0 | | —, (—) | —, (—) | | | | | | | |
| 12 | Glycine soja | Kanin. | 512 | 1024 | 16 | | | | | | | |
| 13 | Robinia pseud-acacia | $A_1$ | 32 | 16 | 8 | | | | | | | |
| | | $A_2$ | 32 | 32 | 4 | | | | | | | |
| | | B | 32 | 32 | 8 | | | | | | | |
| | | 0 | 32 | 16 | 4 | —, (—) | 16, (32) | | —, (64) | | | |
| 14 | Evonymus latifolia | | (Arillus) | | | | | | | | | |
| | | $A_1$ | 2 | | | | | | | | | |
| | | $A_2$ | 64 | —, (—) | —, (—) | —, (—) | —, (—) | —, (—) | —, (—) | | | —, (—) |
| | | B | 256 | | | | | | | | | |
| | | 0 | 256 | | | | | | | | | |
| 15 | Evonymus europaea | $A_1$ | — | | | — | — | — | — | | | |
| | | $A_2$ | 64 | | | 8 | 8 | 32 | 32 | | | |
| | | B | 256 | —, (—) | —, (—) | 8 | 8 | 64 | 64 | | | —, (—) |
| | | 0 | 256 | | | 8 | 8 | 64 | 128 | | | |
| | | Kanin. | 512 | | | 8 | 32 | 128 | 512 | | | |

Die Zahlen bedeuten den Verdünnungsgrad der 1:20 angesetzten Extrakte, bis zu welchem eine Agglutination erfolgte. In Klammern sind die Ergebnisse bezüglich der „inkompletten" Agglutinine angegeben.

So z. B. fanden wir bei *Sophora japonica* und *Coronilla varia* die „Salzagglutinine" in den Kotyledonen und die „Albuminagglutinine" in den Radiculis. Das war aber nicht der Fall bei den Anti-H-Agglutininen aus *Virgilia lutea* und den Anti-$A_1$-Agglutininen aus *Dolichos biflorus*, bei welchen wir nur in den Keimblättern die „Albuminagglutinine" neben den „Salzagglutininen" nachweisen konnten; die Radiculae erwiesen sich als agglutininfrei. Weitere Einzelheiten sind aus der Tabelle zu entnehmen.

2. *Vegetative Pflanzenteile.* Hier waren die Untersuchungsergebnisse ebenfalls sehr unterschiedlich. Die Wurzel von *Vicia cracca* enthielt Salzagglutinine in ziemlich starker Konzentration, die Rinde aus den erdnahen Stengelteilen nur Albuminagglutinine, welche zur Spitze zu mehr und mehr abnahmen. Agglutininfrei waren Blätter, die frisch abgeblühten, unreifen Fruchtstände, und zwar sowohl die jungen Samen als auch die Hülsen und die dazugehörigen Fruchtstiele. Bei *Evonymus europaea* fanden wir in den Blättern und in der Rinde ziemlich kräftige Agglutinine von gleicher Anti-B + H-Spezifität wie im Arillus, wobei die Konzentration mit dem Alter der Rinde zuzunehmen scheint. *Evonymus latifolia* lieferte uns weder aus den Blättern noch den Rinden irgendwelche Agglutinine. Die Wurzeln beider *Evonymus*-Arten waren agglutininfrei. *Laburnum alpinum* andererseits enthielt mittelkräftige Agglutinine in der Rinde, ohne daß hierbei vom Alter abhängige Konzentrationsunterschiede beobachtet wurden. Die Blätter waren aber frei. Ähnlich verhielten sich die anderen Vertreter der Genisteae: *Cytisus praecox* und *Cytisus supinus*. Bei *Lotus tetragonolobus* wurden die Agglutinine nur in den Samen und nicht in den vegetativen Teilen gefunden. Das war auch der Fall bei *Coronilla varia* und bei *Phaseolus multiflorus* mit „unspezifischen" Hämagglutininen in den Samen.

In der Tabelle 1 sind unsere bisherigen Ergebnisse zusammengefaßt aufgezeichnet.

Nach Erhitzen der Extrakte auf 100° C im Wasserbad für $^1/_4$ Std ging die Agglutininaktivität unter Auftreten von Flockenbildung verloren. Lediglich in dem stark aktiven Wurzelextrakt aus *Vicia cracca* waren danach noch „inkomplette" Agglutinine bis zu einer Verdünnung von 1:8 vorhanden.

## Besprechung

Wie unsere Befunde zeigen, ist die Lokalisation der Phytagglutinine in den Samenpflanzen nicht nur auf die Samen selbst oder die Orte der Reservesubstanzspeicherung beschränkt; d. h. die Phytagglutininglobuline können praktisch in allen Pflanzenteilen vorkommen. Unsere Hypothese, daß diese Proteine mit dem Eiweiß-Kohlenhydratstoffwechsel

in Beziehung stehen, gewinnt dadurch an Wahrscheinlichkeit. Es wäre wünschenswert, wenn diesen Substanzen von botanisch-physiologischer Seite her mehr Beachtung als bisher entgegengebracht würde. Für die Blutgruppenserologie sind unsere Feststellungen insofern eine Bereicherung, als man nun nicht mehr in allen Fällen auf reife Samen angewiesen ist, sondern auch andere Pflanzenteile zu anderen Zeiten zwecks Agglutininbereitung verwenden kann. Ob jedoch die einzelnen vegetativen Teile, in denen wir jetzt, kurz vor und während der Reifezeit, Agglutinine gefunden haben, auch im Winter und zur Blühzeit fündig sind, bedarf näherer Nachprüfung. Auf Grund der bisher sich widersprechenden Literaturangaben ist die Möglichkeit einer Wanderung und damit Lokalisationswechsel der Agglutininproteine in der Pflanze im Laufe der Jahreszeiten nicht ganz unwahrscheinlich. Der außerordentlich hohe Gehalt der Radicula von *Laburnum alpinum* an kompletten Anti-H-Agglutininen ist erstaunlich. Er wurde an 1 Jahr alten Samen beobachtet. Anscheinend ist dieses Verhalten eine besondere Eigenschaft der Genisteae (*Laburnum-Cytisus-Genista-Ulex*), da auch das als inaktiv bekannte *Laburnum vulgare* in der Radicula relativ viel Agglutinine und in den Kotyledonen keine enthält. Doch fehlen hierüber bisher eigene Beobachtungen.

Über unsere chromatographischen Untersuchungen an Hydrolysaten der gereinigten Agglutininproteine werden wir in einer II. Mitteilung berichten.

## Zusammenfassung

Es werden Untersuchungen über die Lokalisation der Phytagglutinine, hauptsächlich der „blutgruppenspezifischen", in 15 Samenpflanzen mitgeteilt. Dabei konnte festgestellt werden, daß die Agglutininproteine sowohl in den Samen als auch in sämtlichen vegetativen Pflanzenteilen wie Wurzeln, Stengeln und Blättern vorkommen können. Innerhalb des Embryos der Samen — die Schalen und das Endosperm waren agglutininfrei — wechselt die Agglutininverteilung bei den einzelnen Pflanzen zwischen den beiden Extremen: Kotyledonen agglutininhaltig, Radicula so gut wie frei (Beispiel: *Dolichos biflorus*) und Radicula agglutininhaltig, Kotyledonen fast frei (Beispiel: *Laburnum alpinum*) mit allen Übergängen. Die aus allen Teilen der Pflanze erhaltenen blutgruppenspezifischen Agglutinine waren nicht kochbeständig. Ob diese leicht charakterisierbaren Proteine eine besondere physiologische Bedeutung für die Pflanze haben, wird offen gelassen.

## Literatur

[1] Elfstrand, M.: Über Blutkörperchen agglutinierende Eiweiße. Görbersdorfer Veröff., hrsg. von R. Kobert, S. 1—159. Stuttgart: Ferdinand Enke 1898.

[2] Krüpe, M.: Blutgruppenspezifische pflanzliche Eiweißkörper (Phytagglutinine). Stuttgart: Ferdinand Enke 1956. — [3] Mäkelä, O.: Studies in hemagglutinins of Leguminosae seeds. Ann. med. exper. et biol. fenn., **35**, Suppl. 11 (1957). — [4] Renkonen, O.: Studies on hemagglutinins present in seeds of some representatives of the family of Leguminoseae. Ann. med. exper. et biol. fenn. **26**, 66—72 (1948). — [5] Springer, G. F.: Über das Vorkommen von blutgruppenaktiven Substanzen in der Eibe (Taxus cuspidata). Naturwiss. **1955**, 37—39. — [6] Stillmark, H.: Über Ricin, ein giftiges Ferment aus dem Samen von Ricinus communis L. und einigen anderen Euphorbiaceen. Inaug.-Diss. Dorpat 1888. — [7] Tiggelman-van Krugten, W. A. H., C. M. Ostendorf-Doyer u. V. A. Collier: Antonie van Leeuwenhoeck **22**, 289 (1956).

Priv.-Doz. Dr. med. Martin Krüpe und Dr. rer. nat. Albrecht Ensgraber,
Fulda, Marquardstr. 31

Planta, Bd. 50, S. 379—387 (1958)

Aus dem Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. Melchers, Tübingen

# EXPERIMENTELLE BEEINFLUSSUNG DES GRANAMUSTERS EINER ABWEICHENDEN PLASTIDENSORTE VON ANTIRRHINUM MAJUS

Von

Aloysius Wild

Mit 10 Textabbildungen

*(Eingegangen am 24. August 1957)*

Die Ansichten über die Entstehung des normalen Granamusters sind noch kontrovers. Während Menke (1940), Heitz und Maly (1953), Hodge et al. (1955) und Leyon (1956) auf Grund ihrer Befunde die Meinung vertreten, daß die Grana als Folge einer weiteren Differenzierung oder inhomogenen Verteilung gewisser Komponenten innerhalb der Chloroplastenlamellen entstehen, vertritt Strugger (1950—1956) die Auffassung, daß das Granamuster durch identische Reduplikation der Grana bei der somatischen Entwicklung der Chloroplasten zustande kommt.

Eine schon beschriebene Plastidenmutante von *Antirrhinum majus*, Herkunft E (Maly u. Wild 1956), bot durch die Abhängigkeit ihres Granamusters von Außenfaktoren die Möglichkeit, von einer neuen Seite her die Frage der Entstehung des Granamusters aufzugreifen. — Die Chloroplasten der Herkunft E zeichnen sich gegenüber der Normalform durch wenige, große Grana aus, wenn sie unter den üblichen Bedingungen des Gewächshauses oder im Freiland gebildet werden. In Aufsicht sieht man meist 3—8 große Grana (Abb. 1). In Profilansicht liegen sie in 2—3 Schichten übereinander. In jungen Chloroplasten (⌀ 1,5 $\mu$, Höhe 1 $\mu$) sind die Grana früher als bei der Normalform sichtbar (untersucht in 0,1—0,2 cm großen Blättchen). Die Untersuchungen wurden alle an Schecken durchgeführt, da Pflanzen, die ausschließlich die Plastidensorte E enthalten, nicht lebensfähig sind.

Abb. 1 [1]. E-Chloroplasten mit Granastruktur, im Gewächshaus entstanden

Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnten an normalen Chloroplasten keine auffallenden Veränderungen festgestellt werden.

Starkes Sonnenlicht im Sommer bei anhaltend schönem Wetter schädigte die Chloroplasten der Herkunft E. Die Mehrzahl war dann

[1] Sämtliche Aufnahmen sind von unverletzten Zellen. Vergrößerung jeweils 1280mal, Optik: Leitz Fluorit $^1/_{16}$ 116mal, Ok. 6mal, Miflex Leica-Aufsatz.

sehr schwach gelbgrün gefärbt, und die Grana hoben sich oft nur im Fluorescenzmikroskop gegen das fluorescenzfreie Stroma ab. Die Chloroplasten degenerierten mit den beschriebenen Strukturänderungen (MALY u. WILD 1956) unter diesen Verhältnissen früher. Sie vacuolisierten jedoch selten völlig. Diese Befunde ließen zunächst vermuten, daß die Lichtmenge von entscheidender Bedeutung für das Zustandekommen der Granastruktur und ihrer Degeneration ist.

In einem Vorversuch kamen Schecken „normal + E" in einen Klimaschrank unter Dauerlicht (20 Osram-HNG 200 je 40 W pro qm, Temp. + 20° C, rel. Luftfeucht. etwa 86%). An den Sproßspitzen wurde bei dieser Strahlungsquelle mit einem Luxmeter nach Dr. LANGE (Berlin)

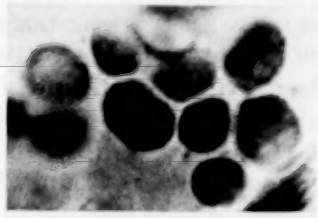


Abb. 2. Homogen grüne E-Chloroplasten, in Dauerlicht entstanden

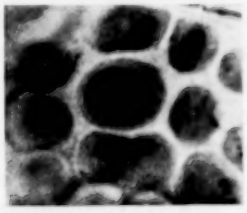


Abb. 3. Farbloses Stroma setzt sich gegen den homogen grünen Teil ab

800—15000 Lux gemessen. Unterschiede in der Lichtintensität wurden durch Variation des Abstandes von den Leuchtröhren erreicht.

Zu Beginn des Versuchs schon ausgebildete Chloroplasten veränderten ihre Struktur nicht wesentlich; erst im Laufe der Zeit degenerierten sie in der für diese Plastidensorte eigentümlichen Weise. Bei den höheren Lichtintensitäten erfolgte die Degeneration schneller.

Ein überraschendes Verhalten, das mit den im Sommer im Freiland und im Gewächshaus gemachten Beobachtungen nicht in Zusammenhang gebracht werden konnte, zeigten die im Dauerlicht neu gebildeten Chloroplasten. Die ausgewachsenen Chloroplasten waren in Aufsicht zunächst homogen grün (Abb. 2). Der ganze Chloroplast fluorescierte intensiv hellrot. In der Profilansicht waren die meisten Chloroplasten homogen grün, ein Teil ließ 2—4 sich durch den ganzen Chloroplasten erstreckende Schichten, die das Chlorophyll enthielten, übereinander erkennen. Später setzte sich vom Rande her farbloses Stroma gegen den noch immer in der Aufsicht homogen grünen Teil der Chloroplasten ab (Abb. 3). Die Profilansicht zeigte nun das Chlorophyll immer in 2—4 Schichten, meist waren es 3 (s. Abb. 4: schematische Zeichnung). Im weiteren Verlauf wurde in der Aufsicht der Durchmesser der Scheiben kleiner. Er betrug aber auch im Endzustand noch über 2 $\mu$. Eine solche Scheibe nenne ich Riesengranum. In überdurchschnittlich großen Plastiden fand ich in Aufsicht manchmal auch 2 solcher Riesengrana (Abb. 5).

Die Pflanzen kamen am 10. 3., nachdem sie 5 Wochen im Klimaschrank gestanden hatten, in das Gewächshaus zurück. Ein Teil der Sprosse, die Intensitäten über 12000 Lux ausgesetzt gewesen waren, zeigten nach den 5 Wochen Dauerlicht größere Schäden und starben z.T. ab. Für die weitere Untersuchung wurden nur noch Blätter verwendet, die bei geringeren Lichtintensitäten entstanden waren.

Die im Dauerlicht des Klimaschranks gebildeten Chloroplasten zeigten nun im Gewächshaus überraschende Veränderungen. Soweit sie noch homogen grün aus dem Dauerlicht-Schrank ins Gewächshaus kamen, bildeten sie nun beschleunigt das Riesengranum aus. Am Rande der Chloroplasten, im farblosen Stroma erschienen in kreisförmigem Ab-

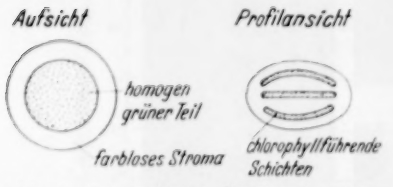



Abb. 4. Schematische Zeichnung: Farbloses Stroma setzt sich gegen den homogen grünen Teil ab

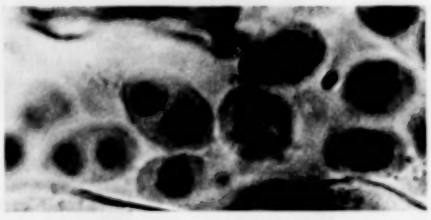


Abb. 5. Riesengrana, in großen Chloroplasten sind es manchmal auch zwei

stand vom Riesengranum neue, zunächst nur punktförmige Grana. Bei einigen Chloroplasten konnte man diese nach 2 Tagen im Fluorescenzmikroskop und am 3. Tag im Lichtmikroskop sehen. Die neuen Grana wurden im Laufe der nächsten Tage größer bei gleichzeitiger Verkleinerung des Riesengranums (Abb. 6, 7). Schließlich hatten die neuen Grana dieselbe Größe wie das „Riesengranum", das als solches dann meist nur noch durch seine zentrale Lage und intensive Färbung erkennbar war (Abb. 8). In Profilansicht waren aber auch in diesem Zustand nicht mehr Schichten als in dem der Riesengrana zu erkennen. Die ausgewachsenen Chloroplasten bildeten also noch nachträglich die für E unter Freiland- oder Gewächshausbedingungen charakteristische Struktur aus.

In einem weiteren Versuch wurde eine größere Anzahl von Schecken unter folgenden Bedingungen gehalten:

1. Elf Pflanzen im Dauerlicht des Klimaschranks; a) Sieben bei einer Lichtintensität von 4000—5000 Lux, b) Vier bei 10000—11000 Lux.

2. Acht Pflanzen in Klimaschränken in einem Licht-Dunkel-Wechsel innerhalb des normalen 24-Std-Cyclus 1:1; a) während der 12stündigen Lichtzeit 4 bei 4000—5000 Lux; b) vier bei 10000—11000 Lux; während der 12stündigen Dunkelzeit in einem ebenfalls auf 20° C und 86% rel. Luftfeuchtigkeit gehaltenen Dunkelschrank.

3. Vier Pflanzen verblieben im Gewächshaus.

Die Lichtintensität wurde gegenüber dem Vorversuch etwas herabgesetzt, um größere Schäden zu vermeiden. Die Intensitätsdifferenz wurde wieder durch verschiedene Abstände der Pflanzen von der Lichtquelle erreicht und fortlaufend nach Messungen mit dem Luxmeter korrigiert. Die Sprosse wurden vor dem Versuch zurückgestutzt und genau markiert.

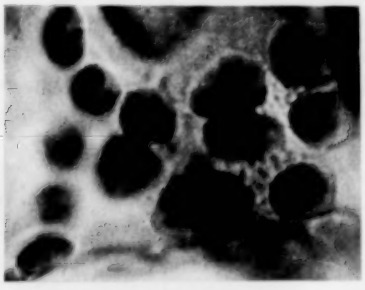


Abb. 6

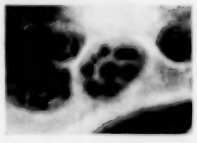


Abb. 7

Abb. 8

Abb. 6. Bildung des Granamusters, das Riesengranum wird kleiner

Abb. 7. Der Größenunterschied zwischen den neuen Grana und dem Riesengranum verschwindet

Abb. 8. Nachträglich gebildetes Granamuster der ausgewachsenen, zuvor homogen grünen Chloroplasten

Die Ergebnisse dieses Versuches sind im folgenden aufgeführt:

1. Alle in Licht-Dunkel-Wechsel gehaltenen Pflanzen zeigten in den unter diesen Bedingungen gebildeten Chloroplasten der E-Blätter und Blattabschnitte die charakteristische Chloroplastenstruktur der Abb. 1.

2. Zwischen den unter natürlichem Tageslicht und Tag-Nacht-Wechsel (12. 8. bis 12. 10.) bei schwankender Temperatur und den in Kunstlicht: Dunkelheit bei 20° C gehaltenen Pflanzen wurden Unterschiede im Verhalten der E-Plastiden nicht beobachtet.

3. Bei 10000—11000 Lux gehaltene Blätter enthielten in ihren E-Plastiden wohl etwas schwächer ausgebildete Grana als unter 4000 bis 5000 Lux gehaltene. Aber in beiden Fällen waren die Grana gegen das nicht fluorescierende Stroma stets gut im Fluorescenzmikroskop abgrenzbar.

4. Alle in Dauerlicht gehaltenen Blätter, sowohl die bei 4000 bis 5000 Lux wie die bei 10000—11000 Lux gehaltenen, entwickelten zunächst wieder homogen grüne Plastiden. Die mit zunehmendem Alter auftretenden Riesengrana erschienen bei der höheren DL-Intensität etwas

schneller als bei der etwa halb so großen; in DL bei 4000—5000 Lux waren noch nach 6—8 Wochen sehr viele Plastiden homogen grün.

5. 4000—5000 Lux Dauerlicht einerseits, 10000—11000 Lux 12-Std-Licht/12 Std Dunkelheit andererseits, hatten völlig verschiedene Wirkungen auf die Struktur der E-Plastiden. Im ersten Falle homogene Plastiden, allenfalls Riesengrana, im zweiten Falle 4—8 Grana in Aufsicht. Für diesen Unterschied kommt es also in erster Linie nicht auf die Lichtmenge, sondern auf den Gegensatz Dauerlicht/Licht-Dunkelrhythmus an.

Ein weiterer Versuch sollte vor allem die Mindestgrenze der täglichen Dunkelzeiten bestimmen, bei der ausgewachsene, im Dauerlicht ent-

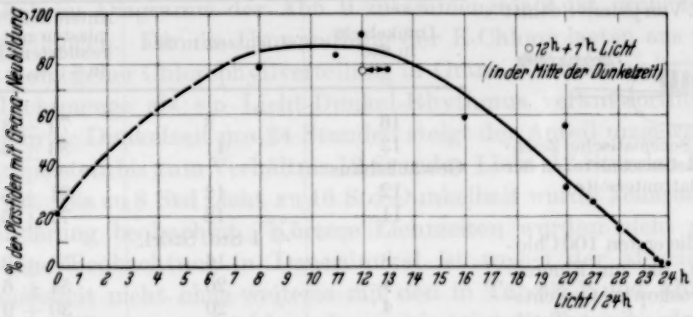

% der Plastiden mit Grana-Neubildung
100
80
60
40
20
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 h
Licht/24h
○ 12h + 1h Licht
(in der Mitte der Dunkelzeit)

Abb. 9. Abhängigkeit der Umwandlung in Dauerlicht homogen grüner Chloroplasten in solche mit Granastruktur vom täglichen Licht-Dunkelverhältnis

standene, homogene Chloroplasten noch neue Grana bilden. Außerdem sollte über einen größeren Bereich die Bedeutung des Licht-Dunkelverhältnisses für diesen Vorgang geprüft werden. Für diesen Versuch wurden nur Pflanzen verwendet, die im Klimaschrank zunächst in Dauerlicht von 4000—5000 Lux gezogen worden waren. Das Dauerlicht wurde nach 8 Wochen durch einen Wechsel von Licht- und Dunkelphasen ersetzt. Die Länge der Dunkelphasen im 24-Std-Zyklus lag zwischen 4 und 16 Std. Bei einer Pflanze wurde die 12-stündige Dunkelphase durch 1 Stunde Licht unterbrochen. Eine andere Pflanze kam in das Gewächshaus zurück (10. 10.). Der Versuch wurde später durch 7 Pflanzen erweitert, für die sonst dieselben Bedingungen galten; sie erhielten aber Dunkelphasen zwischen $^1/_4$ und 4 Stunden. Eine Pflanze wurde 4 Tage lang in völliger Dunkelheit gehalten. Der Anteil von den im Dauerlicht gebildeten Chloroplasten, die nach Ersetzung des Dauerlichts durch einen Licht-Dunkelwechsel neue Grana bildeten, wurde so genau wie möglich quantitativ bestimmt. Der Versuch wurde nach 20—28 Tagen ausgewertet. Das Ergebnis zeigt Tabelle 1. Die Pflanze, die 4 Tage lang in völliger Dunkelheit stand, wurde sofort nach der Dunkelzeit ausgewertet. 21% $\pm$ 5% der ausgewerteten Chloroplasten hatten bei ihr neue Grana gebildet.

Bei diesen Pflanzen zeigte es sich auch, daß in den im Licht-Dunkelwechsel neu hinzuwachsenden Blättern schon die Jungchloroplasten das Granamuster bildeten. In den kurzen Dunkelphasen bildete nur ein Teil der Chloroplasten das Muster aus. Bei $^1/_4$ und $^1/_2$-stündigen Dunkelzeiten schien die Musterbildung zu unterbleiben. Eine genauere Auswertung erfolgte hier nicht.

Bestimmung des Anteils der Chloroplasten, der neue Grana gebildet hatte: Von jeder Pflanze wurden 12 Blätter beliebig abgeschnitten. Nach der Infiltration mit Leitungswasser wurden von jedem Blatt im Mittelteil der Blattunterseite 5 Flächenschnitte mit der Rasierklinge gemacht (siehe Abb. 10). Von jedem Schnitt

Abb. 10. Schematische Zeichnung: Flächenschnitte an der Blattunterseite

wurden die ersten 100 Chloroplasten, die im Fluorescenzmikroskop ins Gesichtsfeld kamen, ausgewertet. Jeder Chloroplast, der in Aufsicht mehr als 2 Grana besaß, wurde in die Klasse derer mit Grananeubildung gezählt. Von den 500 pro Blatt ausgewerteten Chloroplasten wurde der Anteil, der mehr als 2 Grana hatte, als Einzelwert für das arithmetische Mittel genommen. Die Zahl der abgeschnittenen Blätter bestimmte die Zahl der Einzelwerte. Pro Pflanze wurden auf diese Art 6000 Chloroplasten ausgewertet. Die mittlere Schwankung des Mittelwertes wurde nach der Formel bestimmt:

*Tabelle 1*

| Dunkelzeit in Std | Lichtzeit in Std | Anteil der Chloroplasten mit neu gebildeten Grana in %; $\sigma_m \pm$ in % |
|---|---|---|
| 16 | 8 | 79 ± 3 |
| 13 | 11 | 83 ± 4 |
| Gewächshaus | | |
| 12 | 12 | 91 ± 5 |
| 11 | 12 | 77 ± 6 |
| | + 1 Std. Störl. | |
| 8 | 16 | 58 ± 6 |
| 4 | 20 | 54 ± 6 |
| 4 | 20 | 30 ± 9 |
| 3 | 21 | 25 ± 5 |
| 2 | 22 | 14 ± 5 |
| 1 | 23 | 7 ± 2 |
| $^1/_2$ | 23,5 | 0,16 |
| $^1/_4$ | $23^3/_4$ | 0,05 |
| 0 | 24 | 0 |

$$\sigma_m = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (\bar{x} - x_i)^2}{n\,(n-1)}}$$

$x_1$, $x_2$, ... $x_i$ sind die Einzelwerte, aus denen das arithmetische Mittel gebildet wurde, $n$ ist die Zahl dieser Einzelwerte und $\bar{x}$ das arithmetische Mittel der Einzelwerte.

## Diskussion

Der in der Tabelle 1 angeführte mittlere Fehler des Mittelwerts sagt nur etwas über die Genauigkeit, mit der bei den einzelnen Pflanzen der Anteil von den im Dauerlicht gebildeten Chloroplasten, die nach Ersetzung des Dauerlichts durch einen Licht-Dunkelwechsel neue Grana bildeten, quantitativ erfaßt wurde. Über die Schwankungen, die einzelne Pflanzen infolge individueller Eigenschaften hinsichtlich der Stärke der

Reaktion aufweisen können, kann keine sichere Aussage gemacht werden. Da aus dem Dauerlicht nur wenige Pflanzen zur Verfügung standen, konnte für jede Dunkelzeit nur eine Pflanze verwendet werden. Die Differenz der Werte bei den 2 Pflanzen, die täglich einer 4-stündigen Dunkelheit ausgesetzt wurden, zeigt, daß diese Schwankung bedeutend sein kann. Das verschieden schnelle Altern der Pflanzen scheint darauf einen Einfluß zu haben. Den quantitativen Angaben darf daher nicht zu große Bedeutung zugemessen werden.

Dennoch gestattet das gesamte Material des letzten Versuchs, unter Berücksichtigung der Ergebnisse der beiden ersten Versuche, das übersichtlich im Diagramm der Abb. 9 zusammengefaßt ist, wohl folgende Feststellungen. Für die Umwandlung der E-Chloroplasten aus in Aufsicht homogener Chlorophyllverteilung in Grana-Neubildung ist weniger die Lichtmenge als ein Licht-Dunkel-Rhythmus verantwortlich. Mit vermehrter Dunkelzeit pro 24 Stunden steigt der Anteil umgewandelter Chloroplasten bis zum Verhältnis 12 Stunden Licht: 12 Stunden Dunkelheit an. Bis zu 8 Std Licht zu 16 Std Dunkelheit wurde keine auffällige Veränderung beobachtet. Kürzere Lichtzeiten wurden nicht geprüft. Die eine Beobachtung in Dauerdunkel ist wegen der abweichenden Versuchszeit nicht ohne weiteres mit den in Tabelle 1 und Abb. 9 angeführten Werten vergleichbar. Immerhin zeigt die Tatsache, daß schon nach Aufenthalt der Plastiden für 96 Std im Dauerdunkel 21% umgewandelte beobachtet wurden und der gesamte Kurvenverlauf, daß die Dunkelzeit für die Umwandlung entscheidend ist. In Abb. 9 ist der zu diesem Punkt führende Kurventeil gestrichelt gezeichnet. Die kleine Herabsetzung des Prozentsatzes umgewandelter Plastiden durch eine Unterbrechung der Dunkelzeit in deren Mitte durch 1 Std Licht ist nicht signifikant. Keinesfalls annulliert dieses Störlicht die Wirkung der Dunkelzeit, wie man das bei für die Blütenbildung photoperiodisch empfindlichen Kurztagpflanzen gewöhnt ist (Harder u. Bode 1943, Melchers u. Lang 1948, Melchers 1956). Die hier beschriebene Reaktion ist zwar keine rein photoquantitative, sondern ist stark von der Dunkelzeit pro 24 Std abhängig, läßt aber sonst für Kurztagpflanzen charakteristische Momente vermissen nnd verdient auch aus diesem Grunde ein gewisses Interesse. Es darf allerdings nicht übersehen werden, daß eine Ausdehnung der Versuche auf noch kürzere Lichtzeiten, aber auch auf geringere Lichtintensitäten, zu ihrem vollen Verständnis notwendig wären.

Wichtig erscheinen die Befunde aber auch jetzt schon für die Diskussion der Frage, wie ein Granamuster ontogenetisch entsteht. Keinesfalls lassen sie eine Deutung zu, wie sie ursprünglich von Strugger (1950, 1954, 1956) gegeben wurde. Die Kontraktion des in Aufsicht zunächst homogen chlorophyllhaltigen Materials und das Entstehen der neuen

Grana um die Peripherie des Riesengranums, das Heranwachsen der neuen, auf Kosten des Riesengranums, alle diese Vorgänge, die immer wieder beim Überführen der Pflanzen aus Dauerlicht in einen Licht-Dunkel-Rhythmus beobachtet und mit Photogrammen belegt werden konnten, machen eine Erklärung dieser Musterbildung als Folge flächenhafter Reduplikation der Grana völlig unmöglich. Die Entwicklungsschemata der Plastiden bei Perner (1956) verzichten auch schon auf die ursprünglich von Strugger behauptete Ableitung der Grana durch flächenhafte Reduplikation aus dem Primärgranum.

Zum Disput um die Persistenz des Primärgranums vermag diese Mitteilung keinen Beitrag zu liefern.

In guter Übereinstimmung sind die an den E-Plastiden von *Antirrhinum majus* gemachten Befunde dagegen mit den elektronenmikroskopischen Beobachtungen von Steinmann und Sjöstrand (1955), Hodge et al. (1955, 1956), Mühlethaler (1955), Heitz (1955, 1957) und Leyon (1956), die zeigen, daß die Grana feinere Differenzierungen der Stromlamellen darstellen. Schließlich erweitern unsere Befunde die Beobachtungen von Abel (1956) über die Variation der Granagröße und -zahl bei *Anthirrinum*-Plastiden durch Lichteinflüsse. Im Zusammenhang mit unserem Befund über die Beeinflussung des Granamusters soll noch erwähnt werden, daß bei Algen die Chloroplastenlamellen in direktem Zusammenhang mit dem Chlorophyllgehalt reversibel ab- und aufgebaut werden können (Wolken und Palade 1953, Sager und Palade 1954).

Herrn Professor Melchers und Herrn Dr. Maly danke ich für wertvolle Anregungen bei der Durchführung der Experimente und bei der Auswertung der Befunde.

## Literatur

Abel, B.: Über die Beeinflussung der Chloroplastenstruktur durch Licht bei Antirrhinum majus (haploid). Naturwiss. **43**, 136 (1956). — Harder, R., u. O. Bode: Über die Wirkung von Zwischenbelichtungen während der Dunkelperiode auf das Blühen, die Verlaubung und Blattsukkulenz bei der Kurztagpflanze Kalanchoë blossfeld. Planta (Berl.) **33**, 469 (1943). — Heitz, E.: Über die Struktur der Chromosomen und Chloroplasten. Nova Acta Leopoldina, N. E. **17**, 517 (1955). — Die Struktur der Chondriosomen und Plastiden im Wurzelmeristem von Zea Mays und Vicia Faba. Z. Naturforsch. **12**b, 283 (1957). — Heitz, E., u. R. Maly: Zur Frage der Herkunft der Grana. Z. Naturforsch. 8b, 243 (1953.) — Hodge, A. J., M. Branster, E. M. Martin, R. K. Morton, J. D. McLean and F. V. Mercer: Effects of the physical environment on some lipoprotein layer systems and observations on their morphogenesis. J. Biophys. a. Biochem. Cytology Suppl. **2**, 221 (1956). — Hodge, A. J., J. D. McLean u. F. V. Mercer: Ultrastructure of the lamella and grana in the chloroplasts of Zea mays L. J. Biophys. a. Biochem. Cytology **1**, 605 (1955). — Leyon, H.: The structure of chloroplasts. Svensk kem. Tidskr. **68**, 70 (1956). — Maly, R., u. A. Wild: Ein zytologischer Beitrag zur Entmischungstheorie verschiedener Plastidensorten. Z. Vererbungslehre **87**, 493 (1956). — Melchers, G.: Die Beteiligung der endonomen Tagesrhythmik am Zustandekommen der photoperiodischen Reaktion der Kurztagpflanze Kalanchoë

blossfeld. Z. Naturforsch. **11**b, 544 (1956). — Melchers, G., u. A. Lang: Die Physiologie der Blütenbildung. Biol. Zbl. **67**, 105 (1948). — Menke, W.: Die Lamellarstruktur der Chloroplasten in UV-Licht. Naturwiss. **28**, 158 (1940). — Mühlethaler, K.: Untersuchungen über die Struktur und Entwicklung der Plastiden. Protoplasma (Wien) **45**, 264 (1955). — Perner, E. S.: Die ontogenetische Entwicklung der Chloroplasten von Chlorophytum comosum. II. Das Verhalten der Proplastiden bei der Entwicklung zu Jungchloroplasten. Z. Naturforsch. **11**b, 567 (1956). — Sager, R., and G. E. Palade: Chloroplasts structure in green and yellow strains of Chlamydomonas. Exper. Cell Res. **7**, 584 (1954). — Steinmann, E., and S. Sjöstrand: The ultrastructure of chloroplasts. Exper. Cell Res. **8**, 15 (1955). — Strugger, S.: Über den Bau der Proplastiden und Chloroplasten. Naturwiss. **37**, 166 (1950). — Die Proplastiden in den jungen Blättern von Agapanthus umbellatus L. Herit. Protoplasma (Wien) **43**, 120 (1954). — Elektronenmikroskopische Beobachtungen an den Chloroplasten von Chlorophytum comosum. Ber. dtsch. bot. Ges. **69**, 177 (1956). — Strugger, S., u. E. S. Perner: Beobachtungen zur Frage der ontogenetischen Entwicklung der somatischen Chloroplasten. Protoplasma (Wien) **46**, 711 (1956). — Wolken, J. J., and G. E. Palade: An electronmicroscope study of two flagellates. Chloroplasts structure and variation. Ann. New York Acad. Sci. **56**, 873 (1953).

Aloysius Wild, Mainz, Botan. Institut der Universität

Planta, Bd. 50, S. 388—422 (1958)

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität Berlin

# KRITISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR WANDERUNG VON FLUOROCHROMEN IN BLÄTTERN

Von

EVA SCHLAFKE

Mit 15 Textabbildungen

*(Eingegangen am 16. September 1957)*

## Einleitung

Nach der Kohäsionstheorie der Wasserbewegung durchzieht auf Grund der Kohäsionskraft ein ununterbrochener Wasserstrom die Gefäße der Pflanze, dessen Antrieb die Verdunstung an der Pflanzenoberfläche ist. Von STRUGGER (1938, 1939, 1940, 1943) und ROUSCHAL (1940) wurde diese Theorie auch auf die extrafasciculäre Wasserbewegung übertragen. Der Transpirationsstrom setzt sich von den Gefäßen aus in den submikroskopischen Capillaren der Zellwände fort und reicht damit bis an die Oberfläche der Assimilationsorgane, von der aus die Wassermoleküle an die Atmosphäre abgegeben werden. Die Stärke der Wasserabgabe durch die Blätter ist nach KLEMM (1956) von 3 Größen abhängig: „1. vom Gefälle zwischen dem Dampfdruck der zu verdampfenden Flüssigkeit und der umgebenden Luft, 2. von der Größe der verdunstenden Oberfläche und 3. vom Diffusionswiderstand (in den Zellwänden), der die freie Fortbewegung der Wassermoleküle hemmt."

Es ist aber wahrscheinlich, daß außer physikalischen Kräften noch andere Faktoren auf die Wasserbewegung einwirken, die in der Pflanze selbst als einem lebenden System zu suchen sind. Dies gilt vor allem für Guttation und Blutung. Der Wurzel wird mit großer Entschiedenheit eine aktive Beteiligung an der Wasseraufnahme und -leitung zugesprochen. Ebenso ist in den Blättern mit aktiven Prozessen zu rechnen (vgl. HÜLSBRUCH 1956).

Einen Einfluß auf die Wasserbewegung im Blattparenchym schreibt STRUGGER (1938) dem lebenden Plasma zu. Seinen Untersuchungsergebnissen zufolge erfährt das sog. Mittelrippenphänomen und der extrafasciculäre Transpirationsstrom bei *Helodea densa* durch Narkose und Plasmolyse eine Hemmung.

STRUGGER hatte auf abgeschnittene *Helodea*-Blätter Farbstoff-Gelatine-Plättchen gelegt, die Blätter mit Paraffinöl abgedeckt und dann den Verlauf der Farbstoffwanderung in den Membranen verfolgt. Die Schnelligkeit und die Unregelmäßigkeit des Vordringens schienen einen reinen Diffusionsvorgang auszuschließen. Ebenso war eine elektro-

phoretische Wanderung des Farbstoffes unwahrscheinlich. Von der Annahme einer hypothetischen „aktivierten Diffusion" wurde zunächst abgesehen. Es blieb nur die Möglichkeit, daß der Farbstoff, im vorliegenden Falle das *K*-Fluorescein, sich in einen vorhandenen Lösungsstrom einschaltete und passiv mit der Wasserbewegung in den submikroskopischen Capillaren mitgerissen wurde.

Da bei den Versuchsobjekten und der Versuchsmethode ein Transpirationsstrom im Sinne von Landpflanzen ausgeschlossen war, führt Strugger die Ursache für eine Konvektion des Wassers auf einen einseitigen Wasserentzug durch das Paraffinöl zurück. Strugger beruft sich bei dieser Schlußfolgerung auf eine Angabe von Yamaha (1937), nach der Paraffinöl etwas Wasser aufnehmen soll.

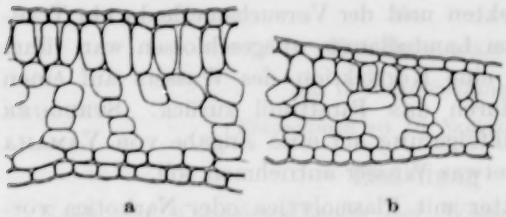
Wurden die *Helodea*-Blätter mit Plasmolytica oder Narkotica vorbehandelt, so erfuhr die Farbstoffeinwanderung je nach Art der Versuchsdurchführung eine totale oder lokale Hemmung. Strugger schloß daraus, daß der lebende Protoplast auf die Wasserbewegung in den Membranen einwirkt, wenn nicht auf die Mechanik der Bewegung selber, so doch zumindest auf ihre Regulation.

Die vorliegende Arbeit wurde unternommen, um zu prüfen, ob das Plasma der parenchymatischen Zellen oder im engeren Sinne die im Plasma stattfindenden Lebensvorgänge einen Einfluß auf den extrafasciculären Transpirationsstrom ausüben. Es wurde die Farbstoffeinwanderung bei normalen unbehandelten Objekten beobachtet und zum Vergleich die Farbstoffbewegung in solchen Blättern, bei denen das Plasma durch Narkotica, Stoffwechselgifte und Plasmolytica eine Hemmung seiner Lebenstätigkeit erfahren hatte.

Für die Untersuchungen dienten zwei Objekte, die durch ihren einfachen anatomischen Bau die Versuchsdurchführung und Beobachtung erleichterten. Die bereits von Strugger verwendete *Helodea densa* wurde als Objekt beibehalten. Die an einer submersen Pflanze gewonnenen Ergebnisse bezüglich der Wasserbewegung können aber nicht ohne weiteres auf eine Landpflanze übertragen werden, obwohl das Prinzip in beiden Fällen das gleiche sein dürfte. Es war daher naheliegend, die Untersuchungen auf eine Landpflanze auszudehnen. Nach Überprüfung mehrerer zartblättriger krautiger Pflanzen (*Galinsoga*, *Urtica*, *Euphorbia*, *Helxine* u. ä.) fiel die Wahl auf *Stellaria media*. Ihre Vorzüge sind: 1. unbeschränktes Vorkommen, 2. Anspruchslosigkeit und Widerstandsfähigkeit gegenüber Umwelteinflüssen, 3. die Blattgröße ist der Kleinheit der Versuchsanordnung angemessen, die parenchymatischen Bereiche sind trotzdem übersichtlich, 4. das Blatt besitzt keine Haare sowie keine anatomisch besonders gestalteten Drüsenbezirke mit Ausnahme einer einzigen Epithemhydathode in der Blattspitze. Es ist ein einfaches Schattenblatt, bei dem das Palisadenparenchym sehr locker gebaut ist. Bei Freilandpflanzen sind die Zellen des Mesophylls größer und der Zellverband etwas dichter als bei Gewächshausmaterial (Abb. 1a, b).

Für den Nachweis von Wasser- und Stoffbewegungen in der Pflanze werden seit einigen Jahren die Fluorescenzfarbstoffe bevorzugt. Sie bieten den Vorteil, daß sie in starken Verdünnungen noch gut sichtbar sind.

Eine Kritik an dieser Methode übt HÜLSBRUCH (1944). Sie ist auf Grund von Untersuchungen am Wurzelparenchym von *Vicia faba* mit dem basischen Berberinsulfat zu der Ansicht gekommen, daß Farbstoffbewegung und Wasserstrom unabhängig voneinander sind. Danach dürften aus dem Verhalten des Farbstoffes keine Rückschlüsse auf den wirklichen Wasserweg gezogen werden. Die Aufgaben von Wurzel- und Blattparenchym und damit auch die Vorgänge in diesen sind jedoch nicht direkt vergleichbar. Die bei der Wurzel ermittelten Gesetzmäßigkeiten brauchen daher nicht auf das Blatt zuzutreffen, worauf HÜLSBRUCH (1956) auch hinweist.



a b

Abb. 1 a u. b. Querschnitt durch Blätter von *Stellaria media*. a Von einer Freilandpflanze, b von einer Gewächshauspflanze

Für die vorliegenden Untersuchungen sind Fluorescenzfarbstoffe auf Grund folgender Überlegungen angewendet worden:

In den Gefäßen der Blattnervatur wird die Geschwindigkeit der Farbstoffbewegung von der des Transpirationsstromes bestimmt. Dafür spricht die Schnelligkeit, mit der der Farbstoff sich ausbreitet. Werden saure Farbstoffe verwendet, die nicht von den Wänden adsorbiert werden, so kann lediglich infolge der Molekülgröße eine geringfügige Verzögerung eintreten, die aber in dem relativ weiträumigen Gefäßsystem kaum von Bedeutung sein wird.

Bei der Wasserbewegung im Parenchym gibt es zwei Möglichkeiten:

1. Die Wassermoleküle folgen weiterhin einem Zug, der durch die Transpiration an der Oberfläche oder den Verbrauch in den Zellen bzw. durch beide auf sie ausgeübt wird. Die Geschwindigkeit ihrer Bewegung ist dann größer als bei einem reinen Diffusionsvorgang. Von diesem beschleunigten Wasserstrom müssen alle in der Lösung befindlichen Stoffe mitgenommen werden, nur daß jetzt in den engen submikroskopischen Capillaren je nach Umfang der in dem Wasser gelösten Moleküle die Geschwindigkeit gegenüber der des Wassers mehr oder weniger verringert wird. Aber auch die Bewegung der gelösten Stoffe muß immer noch schneller sein als bei einer reinen Diffusion. Für kolloidale Lösungen oder sehr große Moleküle wirken die Micellen der Zellwand als Filter, dessen Poren durch die Teilchen verstopft werden. Eine Farbstoffausbreitung bleibt aus (Eosin).

2. Wird kein Zug auf die Wassermoleküle ausgeübt, so bewegen sich diese unbeeinflußt in den Membranen, und entsprechend wird jede in Wasser gelöste Substanz, die nicht in Wechselbeziehung zu den Zellen steht, unter der Voraussetzung eines Konzentrationsgefälles in die submikroskopischen Räume der Zellwände diffundieren. Das Verhalten des Farbstoffes sollte also in jedem Fall einen Rückschluß auf das des Wassers ermöglichen. Es ist damit die z.B. für den Stoff-

transport in den Siebröhren viel diskutierte Alternative Lösungsströmung—Diffusion beschrieben. Auf diese beiden Grundvorgänge muß letzten Endes jede Stoffbewegung im pflanzlichen Organismus zurückzuführen sein.

Entsprechend leitet BAUER (1953) aus den von ihm vorgenommenen Geschwindigkeitsmessungen 2 Bewegungsarten der Fluorochrome ab: „1. Die Diffusion als Grundbewegung; sie ist langsamer als in 10%iger Gelatine und wird — (bei basischen Farbstoffen!) — überlagert durch die Adsorption des Farbstoffes an die Membransubstanz. 2. Eine Lösungsströmung, sie ist der einzige beobachtbare Modus der beschleunigten Farbstoffausbreitung."

In einer kürzlich erschienenen Arbeit berichtet BUTTERFASS (1956) über die Diffusion einiger saurer Fluorochrome in Gelatine. BUTTERFASS ist von dem Gedanken ausgegangen, daß ein Farbstoff infolge der Größe seiner Moleküle dem Wasser nicht überall hin folgen kann. Ein Zusatz quellungsfördernder Agentien bewirkte eine Erweiterung im Gelatinegerüst. Dadurch konnte die Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoffe erhöht werden.

Als Indicatoren für die Wasserbewegung wurden in der Hauptsache einige feindisperse Fluorochrome benutzt, die, außer im stark sauren $p_H$-Bereich, in dissoziierter Form vorliegen und unter den Versuchsbedingungen, jedenfalls nicht in sichtbarer Menge, nicht von den Zellen aufgenommen werden. Eine Farbstoffbindung an die Membran findet nicht statt.

Es waren dies folgende Präparate: Brillantsulfoflavin FF (Hoechst, Frankfurt a. M.), 3-Aminopyren-5,8,10-trisulfosaures-Na, 3-Monomethylaminopyren-5,8,10-trisulfosaures-Na, 3-Oxypyren-5,8,10-trisulfosaures-Na, 3,10-Oxypyren-5,8-disulfosaures-Na (alle von Bayer, Leverkusen)[1].

ZIEGENSPECK (1945) prüfte die Pyrenfarbstoffe unter anderem auf ihre Diffusibilität in Gelatine und auf ihr Wanderungsverhalten in Filtrierpapier (nach GOEPPELSROEDER). Eine ausführliche Beschreibung der Eigenschaften der erwähnten Farbstoffe gibt PERNER (1950). Das Oxypyrentrisulfosaure-Na diente STRUGGER (1939) zum Nachweis der extrafasciculären Komponente des Transpirationsstromes. Es ist seitdem mehrfach in dieser Hinsicht verwendet worden (ROUSCHAL 1940, BAUER 1953, ZACHERL 1956).

Die Fluorescenzintensität des Dioxypyrendisulfosauren-Na ist recht schwach, es wurde daher nur für einige vergleichende Untersuchungen herangezogen.

Für vergleichende Untersuchungen dienten noch folgende Farbstoffe: K-Fluorescein (Bayer, Leverkusen), das, da es vom Plasma aufgenommen wird, ein abweichendes Verhalten bei der Farbstoffbewegung im Parenchym erwarten ließ. SCHUMACHER (1933, 1936, 1937) benutzte diesen Farbstoff als Modellsubstanz für die Stoffwanderung in Siebröhren. Von STRUGGER (1938) stammen Untersuchungen über die $p_H$-Abhängigkeit und Färbungen an *Allium* und *Helodea*.

Primulin (Grübler, Stuttgart) wurde als Beispiel für einen zweiphasischen Fluorescenzfarbstoff herangezogen. Eine blaue Komponente dieses Farbstoffes dringt in den Zellwänden vor und eine gelbgrüne färbt den Zellinhalt. Die beiden Komponenten wurden chromatographisch getrennt und jede für sich verwendet.

[1] Der Firma „Bayer", insbesondere Herrn Dr. H. HARMS, sei auch an dieser Stelle für die Überlassung einiger Präparate vielmals gedankt.

Als Vertreter der basischen Fluorochrome kamen das blau fluorescierende Äsculin (Merck, Darmstadt) und das Acridinorange (Merck, Darmstadt) zur Anwendung.

Die Farbstoffe wurden, soweit nichts anderes erwähnt wird, 1:1000 in Aqua dest. gelöst.

Einige der Farbstoffe wurden capillaranalytisch auf ihr Wanderungsverhalten in Filtrierpapier geprüft. Die nach einer Stunde erhaltenen Differenzen zwischen Wasser- und Farbstofffront, in Prozent der durchwanderten Strecke angegeben, sind Tabelle 1 zu entnehmen.

*Tabelle 1*

Anstieg der Fluorochrome in Filtrierpapier. Die nach einer Stunde erhaltene Differenz zwischen Wasser- und Farbstofffront ist in Prozent der Gesamtstrecke angegeben.

| | |
|---|---|
| K-Fluorescein | 6% |
| Aminopyrentrisulfosaures Na | 13% |
| Brillantsulfoflavin FF | 15% |
| Monomethylaminopyrentrisulfosaures Na | 16% |
| Oxypyrendisulfosaures Na | 16% |
| Oxypyrentrisulfosaures Na | 21% |

Die Geschwindigkeit des Anstiegs in Filtrierpapier ist bei den geprüften Farbstoffen etwa gleich groß, mit Ausnahme des K-Fluorescein, das sich als besonders diffusibel erweist.

Die Diffusion in Gelatine ergab Werte gleicher Größenordnung, wie sie von PERNER (1950) und BAUER (1953) angeführt werden. Nach sinkender Geschwindigkeit geordnet, ist für die Farbstoffe die Reihenfolge: K-Fluorescein > Aminopyrentrisulfosaures Na, Brillantsulfoflavin FF, Primulin > Monomethylaminopyrentrisulfosaures Na, Dioxypyrendisulfosaures Na > Oxypyrentrisulfosaures-Na.

Die Beobachtungen wurden im allgemeinen bei Blaulicht vorgenommen, in einigen Fällen (Äsculin, Primulin) und zu Vergleichszwecken bei UV-Beleuchtung. Als Fluorescenzmikroskope standen die Stative von Leitz, Wetzlar, mit Kohlen-Bogenlampe und von Zeiss-Winkel, Göttingen, mit Osram-Brenner HBO 200 zur Verfügung.

Um eine Beeinflussung des Plasmas zu erzielen, gelangten bei *Helodea* folgende Substanzen zur Anwendung:

*Äther:* 4—5%; Einwirkungszeiten 1 und 3 min.

*Chloroform:* 0,1%; 30 sec und 1 min.

*KCN:* $10^{-1}$, $10^{-2}$, $10^{-3}$, $10^{-4}$, $10^{-5}$ mol/l; 1, 3, 5, 15 und 30 min.

*DNP:* $1{,}1 \cdot 10^{-4}$, $2{,}2 \cdot 10^{-4}$, $3{,}3 \cdot 10^{-4}$, $4{,}4 \cdot 10^{-4}$ mol/l; 1, 3 und 5 min.

*Jodessigsäure:* $10^{-4}$ und $10^{-5}$ mol/l; 1 und 5 min.

*Methyl-, Äthyl-, Propyl-, Butylurethan:* 0,5, 0,2, 0,1, 0,05 mol/l, Einwirkungszeit 1 min.

*Thioharnstoff:* 0,65, 0,13, 0,013, 0,0013 mol/l; 1, 5 und 10 min.

*Äthylenchlorhydrin:* 0,62, 0,12, 0,012, 0,0012 mol/l; 1, 5 und 10 min.

Bei *Stellaria* verwendete ich:

*Äther:* 0,5%; 15 und 30 min.

*Chloroform:* 0,01 und 0,02%; 30 und 45 min.

*Äthylurethan:* $10^{-1}$, $10^{-2} \cdots 10^{-5}$ mol/l; 1, 2, 16 und 24 Std.

*DNP:* $10^{-3}$ und $10^{-4}$ mol/l; 2, 4 und 16 Std.

Ferner wurde zur Gegenprobe Adenosintriphosphat (ATP) als stoffwechselanregende Substanz zugeführt. Nach BOGEN (1953) wird ATP aus wäßrigen

Lösungen schlecht aufgenommen. Es mußte daher im vorliegenden Falle damit gerechnet werden, daß das ATP wohl in das Leitungssystem gelangt ist, aber nicht in die Zellen.

Der besseren Übersicht wegen ist die Arbeit in zwei Teile gegliedert worden, von denen der erste die mit *Helodea densa*, der zweite die mit *Stellaria media* unternommenen Versuche umfaßt.

## A. *Helodea densa*

### Methode

Es wurde zunächst das von STRUGGER (1938) angegebene Verfahren der Gelatineauflage beibehalten, wobei auf Material einheitlichen Alters Wert gelegt wurde, da nach den Untersuchungen von DIEHL (1936), RUGE (1940) und PERNER (1950) die Kutikula im Bereich der meristematischen und der Streckungszone für Farbstoffe impermeabel ist.

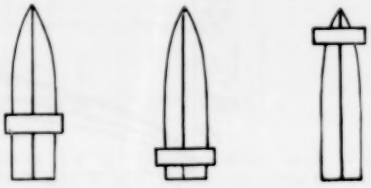


Abb. 2 a—c. Die Auflageorte der Farbstoffgelatine auf den Blättern von *Helodea densa*

Mit einer Farblösung 1:1000 in Aqua dest. wurde eine 10%ige Gelatine hergestellt, die in höchstens 1 mm dicke Platten ausgegossen und, in entsprechend kleine Streifen geschnitten, zum Auflegen auf gesunde, ausgewachsene *Helodea*-Blätter diente. Die Auflage erfolgte im allgemeinen etwas unterhalb der Mitte (Abb. 2a), wurde aber, um Unterschiede herauszufinden, einige Male an der Basis (Abb. 2b) und zur Spitze hin (Abb. 2c) vorgenommen. Auf diese Weise wurden Serien von jeweils 6 Blättern je Objektträger angesetzt, mit Paraffinöl bedeckt und die Einwanderung in bestimmten Zeitabständen kontrolliert. Ferner setzte ich zum Vergleich Versuche zu verschiedenen Tageszeiten an. Die Raumtemperatur betrug, unabhängig von der Jahreszeit, 20—23° C. Die Objekte wurden bei diffusem Tageslicht aufbewahrt.

In einer zweiten Versuchsanordnung kamen Blätter und Sproßabschnitte nach entsprechender Vorbehandlung oder ohne eine solche in die Farblösung. Die Einzelheiten hierzu werden in dem Abschnitt II ausgeführt.

### Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse

Um die Bewegung des Farbstoffes möglichst quantitativ zu erfassen, wurde die durchwanderte Strecke nach Zellängen ausgezählt und in Millimeter umgerechnet. Hierzu wurde der Mittelwert von 5 Zellängen aus 150 Einzelmessungen berechnet: $5x = 0{,}545 \pm 0{,}035$ mm; $x = 0{,}109$ mm.

Der relative Fehler beträgt 6,4%.

Die Ausmessung betraf in jedem Falle nur die mittleren Zellen des Blattes, da die am Blattrand sowie die in der Nähe der Mittelrippe gelegenen Zellen ein abweichendes Verhalten zeigen. Es ist ein deutliches Gefälle in der Farbstofffront von der Mittelrippe zum Blattrand zu beobachten, das um so stärker ausgeprägt ist, je weiter der Farbstoff vordringt. Außerdem muß mit regionalen Unterschieden im plasmatischen Verhalten gerechnet werden (MODER 1932).

Die Beobachtung der Farbstoffwanderung zog sich über einen Zeitraum bis zu 5 Tagen hin. Die Plasmolysefähigkeit und insbesondere die Chloroplastenfluorescenz stellten das Kriterium für den Zustand der Zellen dar. Einzelzellen bzw. Zellbezirke, deren Chlorophyllfluorescenz erloschen war, wurden von der Messung ausgenommen. Nach Beendigung der Beobachtung durchgeführte Plasmolyseversuche mit 1 mol Traubenzuckerlösung ergaben innerhalb weniger Minuten

Vollplasmolyse, und ebenso schnell erfolgte nach Wasserzugabe die Deplasmolyse. Danach wäre anzunehmen, daß das Plasma durch den tagelangen Paraffinabschluß in seiner Vitalität nicht merkbar beeinträchtigt worden ist. Die Blätter waren fast ebenso turgescent wie zu Beginn der Versuche. Ein Wasserentzug kann also nur in geringem Maße erfolgt sein.

BAUER (1952) beobachtete bei Versuchen an Blättern von *Helodea densa* mit der Ursprungschen Streifenmethode innerhalb der ersten 15 min nach Überführung in Paraffinöl eine Kontraktion der *Helodea*-Blättchen und führt sie auf einen Wasseraustritt zurück. Atmungsmessungen mit der Warburg-Apparatur ergaben, daß der Sauerstoffverbrauch unter Paraffinöl auf ein Minimum herabsinkt. Da die Plasmaströmung erhalten bleibt, erwägt BAUER „ob nicht die Zelle bei Belichtung durch Assimilation gespeicherter Bicarbonate eine zusätzliche Sauerstoff-

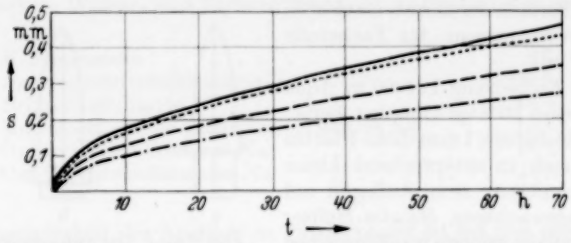



Abb. 3. Die Einwanderung einiger saurer Fluorochrome in die Membranen der Blätter von *Helodea densa*. Brillantsulfoflavin FF ——— (66 Versuche), Aminopyrentrisulfosaures-Na ····· (60 Versuche), Primulin, blaue Komponente ····· (42 Versuche), Monomethylaminopyrentrisulfosaures-Na — — — (60 Versuche), Dioxypyrendisulfosaures-Na — — — (60 Versuche), Oxypyrentrisulfosaures-Na — · — · — (90 Versuche). Abszisse: Zeit $t$ in Stunden h; Ordinate: zurückgelegter Weg $s$ in mm. (Die Kurven für das Aminopyrentrisulfosaure-Na und für die blaue Komponente des Primulins sind identisch, ebenso die für das Monomethylaminopyrentri- und das Dioxypyrendisulfosaure-Na)

quelle hat". Ferner diskutiert BAUER (1952) eine Ansäuerung des Gewebes durch erschwerte $CO_2$-Abgabe. Diese soll in der Folge zu einer erhöhten Fermentaktivität führen.

Die Ergebnisse der Messungen wurden in Kurven dargestellt, der Weg $s$ in mm in Abhängigkeit von der Zeit $t$ in Stunden h. Die gestrichelten Kurven geben die nach dem vereinfachten Fickschen Diffusionsgesetz $s_x = s \cdot \sqrt{x}$ (MÜNCH 1930) berechneten theoretischen Werte wieder, wobei der Wert $s$ für einen Tag aus der experimentell ermittelten Kurve gewonnen wurde.

## I. Gelatineauflageverfahren

### *1. Farbstoffeinwanderung in unbehandelte Blätter*

Aus den Kurven der Abb. 3 geht hervor, *daß die Wanderung saurer Fluorochrome in den Zellwänden dem Diffusionsgesetz entspricht.* Die Geschwindigkeit ist viel kleiner als in Gelatine. Daraus muß geschlossen werden, daß die Diffusionswiderstände für die Farbstoffe in den Membranen sehr beträchtlich sind. Dies könnte auf sehr dichte Lagerung der Zellulosemicellen und -fibrillen deuten. Aber auch eine besonders starke Imprägnierung mit lipophilen Substanzen oder mit Plasma wäre denkbar. Eine Analyse des Feinbaues der Zellwände von Wasserpflanzen könnte hierüber Aufschluß geben.

### 2. *Farbstoffeinwanderung in vorbehandelte Blätter*

**a) Brillantsulfoflavin FF.** α) *Stoffwechselgifte.* In Vorversuchen wurden zunächst die Konzentrationen und Behandlungszeiten bestimmt, bei denen die Zellen nicht oder erst nach längerer Zeit sichtbar geschädigt werden. Für die Hauptversuche fanden dann solche Konzentrationen Verwendung, bei denen sich Schädigungen während der Versuchsdauer einstellten, und weiterhin Lösungen in absteigender Konzentration, so daß mit Sicherheit alle möglichen Grade einer Beeinflussung des Plasmas erfaßt waren. Der Behandlung schloß sich gründliches Ab-

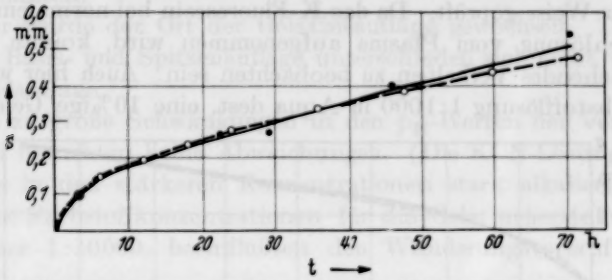



Abb. 4. Die Einwanderung von Brillantsulfoflavin FF in *Helodea*-Blätter nach Vorbehandlung mit einer 4—5 %igen Ätherlösung für 1 und 3 min. Mittelwerte aus 60 Versuchen ———, theoretische Diffusionskurve – – –. Abszisse: Zeit $t$ in Stunden h, Ordinate: zurückgelegter Weg $s$ in mm

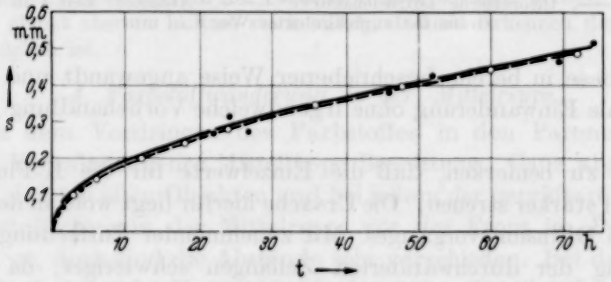



Abb. 5. Die Einwanderung von Brillantsulfoflavin FF in *Helodea*-Blätter nach Vorbehandlung mit Jodessigsäure $10^{-4}$ und $10^{-5}$ mol/l für 1 und 5 min. Mittelwerte aus 96 Versuchen ———, theoretische Diffusionskurve – – –

spülen mit Aqua dest. und sorgfältiges Abtrocknen mit Filtrierpapier an, so daß keine Spuren der verwendeten Lösungen an den Blättern haften blieben. Bei den Versuchsreihen wurde stets ein Objektträger mit unbehandelten Blättern zum Vergleich mitangesetzt.

Geprüft wurden alle auf S. 392 angeführten Stoffwechselgifte. Da die Ergebnisse für alle gleichlautend sind, sollen hier nur die für Äther (Abb. 4) und für Jodessigsäure (Abb. 5) wiedergegeben werden.

β) *Plasmolytica.* Nach Auflage von Farbstoffgelatine bei Blättern, die mit 1 mol Traubenzucker oder 1 mol $KNO_3$ plasmolysiert werden, diffundiert der Farbstoff in die extraplasmatischen Räume hinein. Die Zellwände sind in keiner Weise hervorgehoben.

Nach Auflage einer Farbstoffgelatine mit einem Zusatz von 1 mol Traubenzuckerlösung tritt nach kurzer Zeit bei den unmittelbar am

Gelatinerand gelegenen Zellen Plasmolyse ein. Diese schreitet zur Basis und zur Spitze vor, wobei sich die Plasmolysefront, die anfangs mit der Farbstofffront zusammenfällt, mehr und mehr von jener entfernt und ihr schließlich weit voraus ist. Der Farbstoff diffundiert auch hier in die extraplasmatischen Räume zwischen Zellwand und abgehobenem Plasma hinein.

**b) K-Fluorescein.** Der von STRUGGER verwendete Farbstoff wurde in gleicher Weise geprüft. Da das K-Fluorescein bei normalem $p_H$-Wert der Außenlösung vom Plasma aufgenommen wird, konnte vielleicht ein abweichendes Verhalten zu beobachten sein. Auch hier wurde von einer Farbstofflösung 1:1000 in Aqua dest. eine 10%ige Gelatine her-

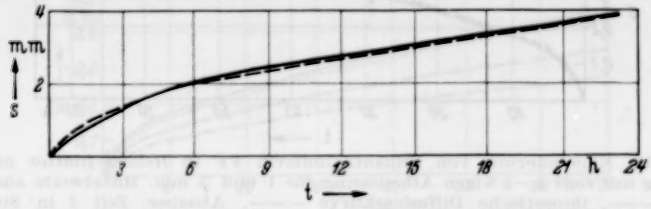



Abb. 6. Die Einwanderung von K-Fluorescein in *Helodea*-Blätter. Mittelwerte aus 144 Versuchen ———, theoretische Diffusionskurve – – –. Abszisse: Zeit $t$ in Stunden h; Ordinate: zurückgelegter Weg $s$ in mm

gestellt, diese in bereits beschriebener Weise angewandt und zunächst die normale Einwanderung ohne irgendwelche Vorbehandlung gemessen (Abb. 6).

Es ist zu bemerken, daß die Einzelwerte für die K-Fluorescein-Kurve viel stärker streuen. Die Ursache hierfür liegt wohl in der Schnelligkeit des Diffusionsvorganges. Mit zunehmender Entfernung wird die Auszählung der durchwanderten Zellängen schwieriger, da von der Mittelrippe her ebenfalls Farbstoff eindiffundiert. Die Unterscheidung der beiden Anteile wird schließlich unmöglich.

Bei den mit Äther und Chloroform behandelten Objekten ist die Diffusionsgeschwindigkeit des Farbstoffes etwas kleiner. Da die Werte aber, wie schon erwähnt, stark streuen, erscheint es fraglich, ob hieraus bereits auf eine Zunahme der Plasmaviscosität geschlossen werden kann.

An einigen Objekten probierte ich das von STRUGGER beschriebene Verfahren der Pastenauflage zum Erzielen einer lokalen Hemmung aus. Die entsprechend den Angaben hergestellte Wollfett-Äther-Paste wurde etwa $^1/_2$ cm vom oberen Gelatinerand entfernt auf die Blätter gestrichen und die Einwanderung in kurzen Zeitabständen beobachtet.

Im Bereich der Mittelrippe ist der Farbstoff bereits nach 1—2 Std über die Pastenzone hinaus bis etwa 20 Zellreihen vor die Spitze gedrungen.

Im Parenchymbereich erfolgt die Wanderung unter der Paste hindurch in gewohnter Weise, wenn die Ätherkonzentration schwach ist. Bei höherem Äthergehalt sterben die unter der Paste gelegenen Zellen sehr rasch ab. Der Farbstoff durchsetzt sie diffus, um jenseits der beschädigten Zone normal weiter zu wandern.

*3. Abänderung der Versuchsbedingungen*

Bei jeder Versuchsreihe wurde an ein oder zwei Objekten das Vordringen des jeweiligen Farbstoffes sowohl zur Spitze als auch zur Basis hin verfolgt und ausgemessen. Die Ergebnisse stimmten völlig überein, so daß mitunter, wenn der Wanderungsbeginn am oberen Gelatinerand nicht klar zu erkennen war, die Zellen am unteren Rand als Ersatz dienen konnten.

Ferner wurde der Ort der Gelatineauflage gewechselt. Die Ergebnisse bei Basis- und Spitzenauflage unterschieden sich nicht von denen bei Mittelauflage.

Nicht zu große Schwankungen in den $p_H$-Werten der verwendeten Lösungen bewirkten keine Abweichungen. (Die KCN-Lösungen waren besonders in den stärkeren Konzentrationen stark alkalisch.)

Andere Farbstoffkonzentrationen für die Gelatineherstellung, etwa 1:100 oder 1:10000, beeinflußten den Wanderungsverlauf ebenfalls nicht.

Die Blätter wurden versuchsweise nicht mit Paraffinöl bedeckt, sondern auf dem Objektträger in feuchter Kammer gehalten. Es sollte hierdurch ein etwa vorhandener störender Einfluß des Paraffinöls ausgeschaltet werden. Die Blattoberfläche glänzt aber in Luft so stark silbrig, daß ein Erkennen der Farbstofffront unmöglich ist.

*4. Farbstoffwanderung in der Mittelrippe*

Neben dem Vordringen des Farbstoffes in den Parenchymzellen fand das Verhalten in der Mittelrippe Beachtung. Ganz allgemein ist zu sagen, daß bei allen Objekten und bei jedem der geprüften Farbstoffe die Farbstoffspitze in der Mittelrippe vor der Front im Parenchymbereich liegt, doch sind die Abstände sehr verschieden. Bei den meisten Farbstoffen beträgt der Unterschied in den ersten Stunden des Versuches etwa 2 Zellreihen und erweitert sich allmählich auf 20—30 Zellreihen, das ist etwa ein Drittel der bis zur Spitze zur Verfügung stehenden Strecke. Bis zur Spitze selbst gelangt in der Versuchszeit außer dem K-Fluorescein kein Farbstoff. Für dieses wurde die durchwanderte Strecke in Bruchteilen der Gesamtstrecke geschätzt. Die Werte sind so unterschiedlich, daß sie nicht in einer Kurve aufgezeichnet werden können. Die kürzeste Frist, in der die Spitze erreicht war, betrug eine halbe Stunde. In den meisten Fällen war ein Zeitraum von 2—3 Std erforderlich.

## II. Farbstoffaufnahme aus wäßrigen Lösungen

Die mit dem Gelatineauflageverfahren gewonnenen Ergebnisse zeigen, daß das Vordringen des Farbstoffes in den Zellwänden ein reiner Diffusionsvorgang ist. Eine Wasserströmung als Folge einseitigen Wasserentzuges durch das Paraffinöl konnte nicht nachgewiesen werden.

Sie ist auch unwahrscheinlich, denn das Paraffinöl bedeckt die Blattoberfläche gleichmäßig und jede Zelle wird, wenn überhaupt, das Wasser direkt nach außen abgeben.

Es bleibt der Einwand, daß unter dem Paraffinöl die normalen Verhältnisse im Blattgewebe verändert werden. Sehr bald wird eine Behinderung der Stoffwechselvorgänge eintreten, insbesondere Atmungshemmung als Folge des Sauerstoffabschlusses (BRAUNER und HASMAN 1946). Davon zunächst abgesehen bleibt ein Objekt, das von jedem Stoffaustausch mit der Außenwelt abgeschnitten ist: Weder Wasseraufnahme noch -abgabe finden statt und das im Gewebe vorhandene Wasser wird nicht an Orte bevorzugten Verbrauches gelenkt. Es wird sich daher in ungerichteter Bewegung, d.h. nach außen hin im Gleichgewichtszustand befinden. Eine neu hinzutretende Substanz muß sich daher diffusionsartig in allen zur Verfügung stehenden Räumen ausbreiten, weil kein Zug auf sie ausgeübt wird.

Auf Grund dieser Überlegungen schien es erforderlich, zu prüfen, ob nicht unter einigermaßen normalen Bedingungen eine Hemmung der Farbstoffbewegung durch Narkotica zu erzielen wäre.

In diesem Zusammenhang soll kurz auf die Stoffaufnahme submerser Pflanzen eingegangen werden.

Wasserpflanzen entnehmen ihren Bedarf an Nährstoffen dem umgebenden Medium mit der ganzen Oberfläche (GESSNER 1956). Der Aufnahme durch die Wurzel kommt nur eine geringe Bedeutung zu, eine Tatsache, die lange Zeit umstritten war.

Daneben ist für Wasserpflanzen ein aufsteigender Wasserstrom nachgewiesen, dessen Antrieb nicht durch die Transpiration der Blätter, sondern fast ausschließlich durch den Wurzeldruck erfolgt. So beschreibt GESSNER, daß abgeschnittene und in Wasser gestellte Blätter von *Lotos* welken, weil sie infolge der anatomischen Beschaffenheit der Leitbündel nicht in der Lage sind, eine ausreichende Wasserversorgung durch Hochsaugen im Stengel zu erzielen. Man kann daher auch keine Farblösungen aufsteigen lassen.

Daraufhin sollte in einigen Vorversuchen das Verhalten der Farbstoffe in bezug auf die Aufnahme durch Stengel und Blätter abgeschnittener *Helodea*-Sprosse geklärt werden.

### *1. Versuche mit Sproßstücken*

**a) Der Farbstoff wird der Sproßachse geboten.** Je ein Sproßstück und ein Sproßende, etwa 5 cm lang, wurden mit dem Stengel in Farblösung eingestellt. Die Farblösung befand sich in kleinen Präparatengläsern, die durch paraffinierte Pappdeckel dicht verschlossen waren, so daß kein Farbstoff austreten konnte. Die Stengel waren durch eine Bohrung des Deckels geführt. Die Gläser mit den Sproßstücken wurden in kleine, mit Leitungswasser gefüllte Cuvetten gestellt. Für diese Versuche wurden sowohl K-Fluorescein wie Aminopyrentrisulfosaures-Na benutzt, beide 1:1000 in Aqua dest. gelöst.

In unterschiedlichen Zeitabständen wurden aus jeder Farblösung jeweils ein junges und ein ausgewachsenes Blatt abgeschnitten, abgespült, mit Filtrierpapier leicht abgetrocknet und in Paraffinöl oder Wasser beobachtet.

**b) Der Farbstoff wird den Blattflächen geboten.** Bei gleicher Versuchsanordnung wurden diesmal die Präparatengläser mit Leitungswasser und die Cuvetten mit Farbstofflösung 1:10000 gefüllt.

Es ergab sich, daß bei den unter a) angeführten Objekten im Verlauf von 3 Tagen kein Farbstoff in die Blätter einwanderte. Der Farbstoff stieg in dieser Zeit lediglich etwas über 1 cm im Stengel hoch.

Die Objekte, deren Blätter sich in Farblösung befanden, hatten den Farbstoff bereits nach kurzer Zeit aufgenommen. Nach 1—2 Std fluorescierten bei ausgewachsenen Blättern Zellwände und Mittelrippe kräftig. Bei jungen Blättern färbte sich der basale Teil ebenfalls schnell, wenn auch nur schwach, an. Der cutinisierte Spitzenbezirk wies dagegen noch nach 2 Tagen kaum Farbstoff auf. Am 3. Tag waren die Membranen im oberen Teil und in der Mitte der Spreite schwach gefärbt. Die Basis zeigte neben einer Fluorescenz der Mittelrippe und der Zellmembranen eine Färbung der Vacuolen, wie durch Plasmolyse mit $KNO_3$ deutlich gemacht werden konnte.

*Tabelle 2*

Die Einwanderung von Monomethylaminopyrentrisulfosaurem-Na aus wäßriger Lösung in die Zellwände der gesamten Oberfläche von ausgewachsenen *Helodea*-Blättchen a) mit, b) ohne Chloroformzusatz. Es bedeuten: — = keine, + — = schwache, + = mittlere, + (+) = starke, + + = sehr starke Fluorescenz.

| Zeit | | Basis | Mitte | Spitze |
|---|---|---|---|---|
| $14^{40}$ | a) | — | — | — |
| | b) | — | — | — |
| $15^{10}$ | a) | — | — | +— |
| | b) | — | — | +— |
| $15^{40}$ | a) | +— | +— | +— |
| | b) | +— | +— | + |
| $16^{10}$ | a) | +— | + | + |
| | b) | +— | + | +(+) |
| $16^{50}$ | a) | +— | + | +(+) |
| | b) | +— | + | +(+) |

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die Farbstoffaufnahme bei Sproßstücken von *Helodea* nicht über den Stengel erfolgt, dessen reduzierte Leitbündel im übrigen für eine Versorgung aus der Wurzel nicht geeignet erscheinen. Die ganze Blattfläche ist befähigt, den Farbstoff aus dem umgebenden Medium aufzunehmen.

Ausführliche Untersuchungen über die Aufnahme von Farbstoffen durch junge Blätter von *Helodea densa* hat Ruge (1940) unternommen. Er fand, daß die Farbstoffe nicht mit der ganzen Oberfläche aufgenommen werden, sondern nur von Blattspitze, Schnittrand oder Wundstellen her eindiffundieren, und daß für die Geschwindigkeit der Anfärbung nicht allein die Diffusionswiderstände im Blatt, oder anders ausgedrückt, der Dispersitätsgrad der Farbstoffe maßgebend ist, sondern zugleich die Lipoidlöslichkeit.

**c) Farbstoffaufnahme bei Chloroformzusatz.** In Fortsetzung der unter b) beschriebenen Versuche erhielt die Farblösung einen Zusatz von Chloroform in einer Konzentration von 0,05%. Die Prüfung der Farbstoffaufnahme erfolgte wiederum durch Blattentnahme.

*Versuchsprotokoll.* Um $12^{00}$ wurden je ein 6 cm langes Sproßende mit 12 Wirteln in Behälter mit Monomethylaminopyrentrisulfosaurem-Na 1:100000 a) mit

Chloroform, b) ohne Chloroform gebracht. Die Chloroformkonzentration wurde möglichst konstant gehalten.

Bis um 14⁰⁰ hatte keine sichtbare Farbstoffaufnahme stattgefunden (die Zellwände fluorescieren an sich schwach gelblich), daher wurde die Konzentration auf 1:10000 erhöht. Die Ergebnisse sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Die Membranen im Spitzenbezirk zeigen immer eine etwas stärkere Fluorescenz als die des übrigen Blattes.

Die Unterschiede zwischen den mit Chloroform behandelten und den unbehandelten Sproßstücken sind so geringfügig, daß aus diesen Versuchen wohl kaum auf eine Hemmung der Farbstoffaufnahme geschlossen werden kann. Es wäre allerdings möglich, daß entweder die

*Tabelle 3*

Die Einwanderung von Aminopyrentrisulfosaurem-Na aus wäßriger Lösung in die Zellwände der ganzen Oberfläche von ausgewachsenen *Helodea*-Blättern mit und ohne Einwirkung von Chloroform. Bedeutung der Zeichen wie in Tabelle 2.

| Chloroform in wäßriger Lösung | | Farbstofflösung | Objekte | |
|---|---|---|---|---|
| Konzentration % | Behandlungsdauer min | Behandlungsdauer min | unbehandelt | behandelt |
| 1 | 1 | 1 | ++ | abgetötet, schwache diffuse Färbung |
| 1 | 1/2 | 1 | ++ | abgetötet, schwache diffuse Färbung |
| 1 | 1/4 | 1 | + | + |
| 0,5 | 1 | 1 | + | abgetötet |
| 0,5 | 1/2 | 1 | ++ | tot, farblos |
| 0,2 | 1 1/2 | 1 | ++ | ++ |
| 0,2 | 1 | 1 | ++ | ++ |
| 0,1 | 3 | 1 | ++ | ++ |
| 0,1 | 1 | 3 | ++ | ++ |
| Bei den folgenden Objekten enthielt auch die Farbstofflösung Chloroform in einer Konzentration von 0,3% | | | | |
| 0,3 | 5 | 5 | ++ | tot |
| 0,3 | 3 | 3 | ++ | stellenweise abgestorben, wo noch lebend ++ |
| 0,3 | 3 | 2 | ++ | Mosaik aus lebenden und toten Zellen, Membran der lebenden Zellen ++ tote Zellen diffus |
| 0,3 | 2 | 3 | ++ | tot |

Konzentrationen des Narkoticums zu schwach oder die Beobachtungsabstände ungünstig gewählt waren. Aus diesem Grunde wurde die Konzentration erhöht und die Versuchszeit so weit verkürzt, daß die Farbstoffeinwanderung besonders in ihren Anfängen erfaßt werden konnte.

### 2. *Versuche mit Blättern*

Die Versuche führte ich in der Weise fort, daß ich die abgeschnittenen *Helodea*-Blätter wie beim Gelatineauflageverfahren vorbehandelte und dann kurzfristig in Farblösung einbrachte. Als Farbstoff fand diesmal Aminopyrentrisulfosaures-Na in Leitungswasser Verwendung, als Narkoticum wieder Chloroform in unterschiedlichen Konzentrationen und bei verschiedener Behandlungsdauer. Das Versuchsprotokoll ist in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Diese Ergebnisse beweisen eindeutig, daß auch die Farbstoffaufnahme aus wäßriger Lösung nicht durch Narkose zu hemmen ist. Der Farbstoff diffundiert lediglich auf Grund des Konzentrationsgefälles in die Membranen ein, ganz unabhängig vom physiologischen Zustand der Zellen. Wenn das Plasma abgetötet ist, kann das Fluorochrom in die Zelle eindringen und färbt diese diffus an.

## Besprechung der Ergebnisse

Die Versuche an *Helodea densa* haben ergeben, daß *die Farbstoffwanderung in den Zellwänden ein reiner Diffusionsvorgang ist, dessen Geschwindigkeit im wesentlichen von der Teilchengröße der Farbstoffe und dem Diffusionswiderstand in den submikroskopischen Capillaren der Membranen abhängt.*

Der Farbstoff wird bei ausgewachsenen Blättern sehr schnell durch die Oberfläche aufgenommen und bleibt auf die Zellwände als Wanderbahn beschränkt. Eine Aufnahme in die Zelle findet nur bei jungen Blättern im meristematischen Bereich statt, wie es schon PERNER (1950) beschrieben hat.

Die Intensität der Fluorescenz ist von Anfang an überall fast gleich groß, so daß keine Bezirke verstärkter oder bevorzugter Aufnahme zu erkennen sind. *Stoffwechselvorgänge wirken weder fördernd noch hemmend auf die Farbstoffbewegung ein.* Eine Schädigung durch Plasmagifte beeinflußt daher die Diffusion nicht. Es wird allenfalls durch Verengung oder Erweiterung der submikroskopischen Capillaren eine geringfügige Änderung der Diffusionsgeschwindigkeit hervorgerufen. Erst wenn die Zelle abgetötet ist, vermag der Farbstoff in das Innere zu diffundieren, wobei sich die Geschwindigkeit des Vordringens nicht wesentlich ändert. Genaue Aussagen über die Schnelligkeit der Einwanderung im toten Gewebe können nicht gemacht werden, denn die Menge des ursprünglich auf die Wände beschränkten Farbstoffes erstreckt sich nun über die ganze Breite des Blattes, wobei die Zellen nur noch schwach diffus gefärbt erscheinen. Die Farbstofffront ist nicht mehr mit Sicherheit festzustellen, da die leuchtende Kontrastfarbe des Chlorophylls einem wenig auffälligen Graugrün gewichen ist.

*Durch die Paraffinölbedeckung wird keine Zugwirkung auf die Farbstoffbewegung ausgeübt*, so daß die Voraussetzung von STRUGGER (1938),

wonach einseitiger Wasserentzug eine Strömung hervorruft, nicht zutrifft. Der Sauerstoffmangel unter Paraffinöl scheint die Lebenstätigkeit der Zellen nicht merklich zu beeinträchtigen, jedenfalls nicht, soweit es im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen von Bedeutung ist.

Die Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoffe in den Membranen ist wesentlich geringer als in Gelatine. Dies war zu erwarten, da in den Zellwänden größere Diffusionswiderstände vorliegen dürften als in Gelatine. Bereits Ruge (1940) fand, daß manche der von ihm verwendeten Farbstoffe das *Helodea*-Blatt in wenigen Stunden durchsetzt hatten, während andere, nämlich die sauren, in 3 Tagen nur wenige Zellschichten weit vorgedrungen waren. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den hier mitgeteilten Befunden.

Daß die Aufnahme von Stoffen durch die Blattfläche von *Helodea* einem Diffusionsprozeß entspricht, nehmen Gessner und Kaukal (1952) an. Sie untersuchten die Aufnahme von Phosphat durch *Helodea* und *Myriophyllum* aus bewegter und ruhender Lösung und stellten dabei fest: „In allen Fällen ergab sich sowohl aus stagnierenden wie aus bewegten Lösungen eine Phosphataufnahme, welche der Konzentration streng proportional war. Daraus wurde der Schluß gezogen, daß die Nährstoffaufnahme durch die Blätter submerser Phanerogamen dem Diffusionsgesetz entspricht und demnach nicht als aktiver Vorgang anzusprechen sei."

## B. *Stellaria media*

### Methode

Bei den Versuchen mit *Stellaria media* kam es darauf an, mit Material zu arbeiten, das vor Beginn der Versuche unter konstanten Bedingungen gehalten worden war, da nach Klemm (1956) der Wassergehalt der Mesophyllzellen eine Regulation der stomatären Transpiration bewirkt. Klemm fand, daß die Intercellularenluft nicht jederzeit wasserdampfgesättigt ist, wie bisher angenommen wurde, sondern der Dampfgehalt von der Feuchtigkeit der Außenluft und der Spaltöffnungsweite abhängt. Den Membranen kann daher bei stärkerer Herabsetzung des Feuchtigkeitsgehaltes der Intercellularenluft Wasser entzogen werden, und es tritt eine Entquellung der Zellwände auf. Dadurch wird der Diffusionswiderstand für den Durchtritt der Wassermoleküle in den Membranen erhöht, und es erfolgt eine Herabsetzung der Transpiration.

Um die für vergleichende Betrachtungen erforderliche gemeinsame Grundlage herzustellen, wurden die Pflanzen vor dem Ansetzen der Versuche einige Zeit unter einer Glasglocke aufbewahrt, die mit angefeuchtetem Filtrierpapier ausgekleidet war. Die relative Feuchtigkeit, gemessen mit einem Lambrechtschen Hygrometer, betrug 100%. Es muß betont werden, daß ein zu langer Aufenthalt der Objekte in dieser hohen Luftfeuchtigkeit unzweckmäßig ist. Die Transpiration wird völlig

unterdrückt, und ein etwa vorhandenes Sättigungsdefizit ist nach kurzer Zeit aufgefüllt. Bei abgeschnittenen Sprossen entfällt ferner der Wurzeldruck als Antrieb für eine Wasserbewegung. So erwähnt Coster (1931), daß allein durch das Abschneiden eine Veränderung in der Wasserbewegung eintritt. Er hält das rasche Welken selbst unter Wasser abgeschnittener krautiger Pflanzen für eine Folge verminderter Wasserzufuhr bei gleichbleibender Transpirationsstärke. Durch den Einfluß des Abschneidens wird die Geschwindigkeit der Wasserbewegung fast immer herabgesetzt. Da es bei den durchzuführenden Untersuchungen aber nicht auf Absolutwerte ankam, konnten die durch das Abtrennen hervorgerufenen Ungenauigkeiten unberücksichtigt bleiben. Eine Herabsetzung der Geschwindigkeit erschien sogar vorteilhaft, weil dadurch Einflüsse auf die Wasserbewegung deutlicher in Erscheinung treten mußten. Im vorliegenden Fall tritt bereits eine vollständige Hemmung der fasciculären Wasserbewegung ein und erst recht der extrafasciculären. Dieser Stagnationseffekt ist analog dem von Strugger (1939) an submergierten Sprossen beobachteten. Ferner muß damit gerechnet werden, daß eine Wasseraufnahme durch die Blattspreite erfolgt und ein invertierter Wasserstrom entsteht. Hierauf wird an einer späteren Stelle noch eingegangen.

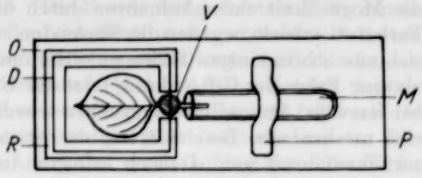



Abb. 7. Die Versuchsanordnung zur Untersuchung der Farbstoffeinwanderung in ein Blättchen von *Stellaria media*. Es bedeuten: *O* Objektträger, *M* Mikroväschen, *P* Plastilin, *V* Vaseline, *R* Rahmen aus Filtrierpapier, *D* Deckglas

Für die Untersuchungen wurden die oberen Blätter der Sprosse ausgewählt, soweit sie voll entwickelt und unbeschädigt waren. Die Blätter aus verschiedenen Insertionshöhen weichen im anatomischen Bau voneinander ab (Stålfelt 1956). Je höher das Blatt inseriert ist, um so „xeromorpher" ist sein Gewebe angelegt. Insbesondere besitzen die jüngeren, also die höher inserierten Blätter, eine stärkere Saugkraft. Sie werden eher versorgt als die älteren tieferstehenden. Dies ist beim Anstieg einer Farbstofflösung in Sproßstücken deutlich zu sehen (Strugger 1939, Rouschal 1940). Beiler (1944) stellte an *Pisum sativum* fest, daß Alter und Insertionshöhe der Blätter für die Größe des natürlichen Sättigungsdefizites bestimmend sind. Auf Grund dieser Unterschiede zwischen älteren und jüngeren Blättern wurde das Versuchsmaterial immer der gleichen Insertionshöhe entnommen.

Die Blätter wurden mit einer scharfen Rasierklinge unter Wasser vom Sproß abgetrennt und, in Anlehnung an die Struggersche Methode, in Mikroväschen gesteckt, die entweder Leitungswasser oder die jeweils verwendete Giftlösung enthielten und zur Erleichterung der mikroskopischen Untersuchung mit Plastilin auf einem Objektträger befestigt waren. Um ein Verrutschen des Blattes sowie das capillare Hochsteigen von Wasser am Stiel zu verhindern, wurde dieser etwas unterhalb der Einmündung in die Spreite mit Vaseline auf den Objektträger geklebt (Abb. 7).

Obwohl die Beobachtung im Fluorescenzmikroskop jedesmal nur kurze Zeit dauerte, mußte mit einem Ansteigen der Transpiration infolge lokaler Erwärmung gerechnet werden. Die Blätter wurden daher für die Dauer der Farbstoffeinwanderung mit einem Rahmen aus dickem, stark saugfähigem, wassergetränktem Filtrierpapier umgeben. Auf den Rahmen kam ein Deckglas, so daß sich das Blatt in einer feuchten Mikrokammer befand, deren hohe Dampftension eine Wasserabgabe durch die Blätter erschwerte bzw. unmöglich machte.

Dieser Punkt ist häufig nicht genügend beachtet worden. Aber gerade bei zartblättrigen krautigen Pflanzen, die noch dazu wie *Stellaria* einen hohen Wasser-

verbrauch aufweisen (Wetzel 1924), beeinflußt die Erwärmung, die z. B. eine Quecksilberhochdrucklampe als Lichtquelle hervorruft, die Farbstoffeinwanderung nicht unwesentlich. Wird das Licht nur wenige Sekunden auf eine bestimmte Stelle eines ungeschützten Blattes gerichtet, so schießt in dem zu dieser Stelle führenden Seitennerv der Farbstrom hoch. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß Mitteilungen über unregelmäßige Anfärbungen zum Teil auf derartige lokale Erwärmungen zurückzuführen sind.

Es empfiehlt sich nicht, die Deckgläser allzu lange vor Versuchsbeginn auf die Blätter zu bringen. Einerseits kann bei der extrem hohen Luftfeuchtigkeit sowie der Enge des Raumes sehr schnell eine Unterdrückung der Wasserbewegung erfolgen, wie eben erwähnt. Andererseits schlägt sich aus dem gleichen Grunde bald Kondenswasser am Deckglas nieder — hierdurch wird die genaue Betrachtung des Einwanderungsverlaufes erschwert — und ebenso am Blatt selbst, wobei wieder die Möglichkeit einer Aufnahme durch die Oberfläche besteht. Bevor das Blatt Farbstoff erhielt, wurden die Stielenden noch einmal nachgeschnitten. Es zeigte sich nämlich in einigen Fällen eine Hemmung der Farbstoffaufnahme, die zunächst als eine Folge der Giftwirkung oder der Unterdrückung des Transpirationsstromes bei feuchter Atmosphäre angesehen wurde, aber, wie der Augenschein lehrte, auf eine mechanische Beschädigung der Stiele durch längeren Aufenthalt im Wasser zurückzuführen war. Danach erfolgte Auswechslung der Röhrchen gegen solche, die mit Farbstoff gefüllt waren.

Für die *Stellaria*-Versuche wurde in der Hauptsache das Aminopyrentrisulfosaure-Na benutzt, da es von den Pyrenfarbstoffen in bezug auf Fluorescenzstärke und Diffusionsgeschwindigkeit am geeignetsten war. Zum Vergleich wurde an einigen Objekten die Einwanderung von Oxypyrentrisulfosaurem-Na, Brillantsulfoflavin FF und K-Fluorescein verfolgt. Die Farbstoffe waren 1:1000 in Aqua dest. gelöst. Die Verwendung von Leitungswasser oder anderen Konzentrationen ergab keine Unterschiede.

## Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse

In der Literatur sind im allgemeinen genaue qualitative Beschreibungen des Verlaufes der Farbstoffeinwanderung mit den dazugehörigen Zeitangaben zu finden. Eine quantitative Erfassung ist dagegen seltener. Von Hülsbruch (1944) und von Bauer (1953) liegen Zahlenwerte vor über die Geschwindigkeit der Berberinsulfatwanderung im Wurzelparenchym von *Vicia faba*, von Rouschal (1940) über den Anstieg von Oxypyrentrisulfosaurem-Na in Stengel und Blattnerven krautiger Pflanzen und von Zacherl (1956) über die Aufnahme von Fluorochromen bei Moosen mit verschiedenen Typen des Zentralstranges. Die Ursache für das Fehlen zahlenmäßiger Angaben ist wohl in der scheinbaren Unübersichtlichkeit und Unregelmäßigkeit des Vorganges zu suchen. Es ist aber unumgänglich nötig, für vergleichende Betrachtungen einen objektiven Maßstab zu wählen, denn der Gesamteindruck der Farbstoffausbreitung läßt nicht immer definitive Schlüsse auf die Einzelheiten zu. So kann z. B. bei einem Blatt das Netz der Leitbahnen dichter sein als bei einem anderen. Jenes färbt sich daher schneller durch als dieses, obwohl die Wanderungsgeschwindigkeit in beiden Fällen die gleiche ist. Oder die Farbstoffausbreitung ist an einer Stelle des Blattes aus irgendeinem Grunde unterbrochen, und das angrenzende Areal bleibt ungefärbt. Das Blatt scheint dann in seiner Gesamtheit weniger gefärbt zu sein, obwohl die Wanderung in den übrigen Bezirken mit gewohnter Stärke stattgefunden hatte.

Um solche subjektiven Fehler bei der Beurteilung möglichst zu vermeiden, ist die von dem Farbstoff im Parenchym durchwanderte Wegstrecke in bestimmten Zeitabständen mit dem Okularmikrometer ausgemessen worden.

Ich notierte den Zeitpunkt, zu welchem der Farbstoff im Hauptnerv vom Stiel her in die Spreite einwanderte, und in Abständen von wenigen Minuten stellte ich fest, wie weit er im Hauptnerv vorgedrungen war, bis er schließlich die Blattspitze erreicht hatte. Inzwischen hatten sich die Seitennerven bis hinunter zu den kleinsten Verzweigungen angefärbt. Die Breite der gefärbten Leitbündel wurde zu diesem Zeitpunkt gemessen und hier der Beginn der allgemeinen Parenchymfärbung festgesetzt. Von nun an verfolgte ich die fortschreitende Ausbreitung des Farbstoffes im Parenchym in der Weise, daß die Breite der gefärbten parenchymatischen Zone über den Nerv hinweg nach beiden Seiten ausgemessen wurde, also die Entfernung zwischen der Farbstofffront auf der einen Seite des Leitbündels und der Front auf der anderen Seite. Die Halbierung des ermittelten Wertes ergab dann die von einer Seite des Nerven her durchwanderte Strecke. Vom Leitbündel aus zu messen ist nicht angebracht, da mit zunehmender Fluorescenzintensität seine Lage nicht mehr deutlich zu erkennen ist. Die Breite der gefärbten Zone wurde bei jeder Ablesung an fünf bis zehn Stellen des Blattes ausgemessen, bei denen die Parenchymwanderung etwa zur gleichen Zeit begonnen hatte, und daraus der Mittelwert errechnet. Die Ergebnisse zeichnete ich der Anschaulichkeit halber ebenfalls in Kurvenbildern auf. Für die Kurven (ausgezogene Linien) faßte ich die Werte der einzelnen Versuche zu einem gemeinsamen Mittelwert zusammen. Die gestrichelte Linie bezeichnet wiederum die nach der vereinfachten Form des Fickschen Diffusionsgesetzes errechneten theoretischen Werte. Die Fehlerrechnung ergab für 100 Einzelmessungen einen relativen Fehler von 2,4%, für 50 der zu den Kurven verwendeten Mittelwerte einen relativen Fehler von 2,1%.

Bei den Kurven, die den Verlauf der Farbstoffeinwanderung im Hauptnerv zeigen, ist der Weg in Prozent der Gesamtlänge des Blattes angegeben. Die Länge der Blätter war trotz des einheitlich ausgewählten Materials recht unterschiedlich. Sie schwankte zwischen 20 und 40 mm. Die Werte, in Millimetern ausgedrückt, wären daher sehr stark voneinander abgewichen.

### *1. Farbstoffeinwanderung in unbehandelte Blätter*

**a) Einfluß der Luftfeuchtigkeit.** Zunächst war es notwendig zu prüfen, welchen Einfluß die Luftfeuchtigkeit auf die Farbstoffeinwanderung im extrafasciculären Bereich der Blätter hat. Die Angaben von ROUSCHAL (1940) beziehen sich auf Pflanzen unterschiedlicher Standorte, Gewächshaus und Freiland. Sie wurden ferner verschieden lange in einer feuchten Kammer belassen.

Einige Blätter wurden vor und bei den Versuchen unter 50—60% Luftfeuchtigkeit gehalten. Der Verlauf der Farbstoffbewegung im Hauptnerv und im Parenchym ist in Abb. 8 und 9 dargestellt.

Der Farbstoff, in diesem Fall Aminopyrentrisulfosaures-Na, hat die Blattspitze in wenigen Minuten erreicht, und die Verteilung auf die Nervatur nimmt nur wenig Zeit mehr in Anspruch. Die Diffusion in das Parenchym setzt augenblicklich ein, und zwar unter ganz entschiedener Bevorzugung des Spitzenbezirkes, während Mitte und basaler Teil in der Versorgung zurückbleiben. Es entsteht der Eindruck, daß die Hauptmasse der Farbstoffteilchen mit solcher Geschwindigkeit in den größeren Gefäßen von der Strömung mitgezogen wird, daß in der unteren Blatthälfte nur wenige Moleküle Gelegenheit haben, in die Seitennerven

einzudringen oder in das Parenchym einzuwandern. Die Konzentration in der Spitze nimmt schnell zu. Die Fluorescenz ist dort daher sehr stark; es treten Überstrahlungserscheinungen auf, d.h. der Farbstoff scheint weiter verbreitet zu sein, als er es in Wirklichkeit ist. Bei hinreichender Übung vermag man diesen Beobachtungsfehler etwas zu korrigieren. Da die Werte insgesamt etwas höher liegen, ändert sich überdies nichts am Gesamtergebnis.

Nachdem der Spitzenbezirk fast vollständig angefärbt ist, setzt die Färbung im Parenchym von Mitte und Basis des Blattes ein. Unter Berücksichtigung dieser Verzögerung bei der Messung bleibt der zeitliche Ablauf der Färbung in allen Bezirken gleich und entspricht in jedem Fall der gezeigten Kurve, *die ganz eindeutig mit der Diffusionskurve identisch ist.*

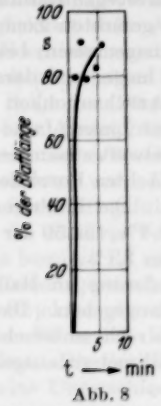



Abb. 8

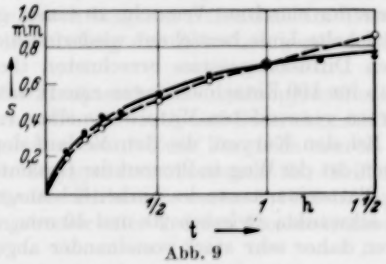



Abb. 9

Abb. 8. Die Einwanderung von Aminopyrentrisulfosaurem-Na in den Hauptnerv von *Stellaria*-Blättern bei 50—60% Luftfeuchtigkeit. Abszisse: Zeit $t$ in Minuten; Ordinate: Weg $s$ in Prozent der Blattlänge

Abb. 9. Die Einwanderung von Aminopyrentrisulfosaurem-Na von den Nerven in die Zellwände der Epidermis und des Mesophylls von *Stellaria*-Blättern bei 50—60% Luftfeuchtigkeit. Abszisse: Zeit $t$ in Stunden h; Ordinate: Weg $s$ in mm. Mittelwerte aus 10 Versuchen ———, theoretische Diffusionskurve — — —

Ein Feuchtigkeitsgehalt der Luft von 40—50% bei Zimmertemperatur stellt ein Minimum für *Stellaria* dar. Besonders Gewächshausmaterial ist sehr empfindlich gegen trockene Luft. Die Blätter welken fast augenblicklich, ein Farbstoffanstieg unterbleibt ganz. BEILER (1944) weist z.B. darauf hin, daß in einem bestimmten Welkestadium „die Pflanzen sich infolge des stark veränderten physiologischen Zustandes trotz des absolut steigenden Sättigungsdefizites nicht mehr genügend aufsättigen".

Es folgte nun die Beobachtung von Blättern, die kürzere oder längere Zeit bei $f_r = 100\%$ aufbewahrt worden waren. Die Kurven a, b und c in Abb. 10 geben den unterschiedlichen Verlauf der Farbstoffeinwanderung im Hauptnerv wieder.

Dauerte der Aufenthalt in der feuchten Kammer nur wenige Stunden (Kurve a), so benötigte der Farbstoff für drei Viertel der gesamten Weg-

länge nur wenige Minuten, also nicht viel mehr, als bei trocken gehaltenen Objekten. Im letzten Viertel trat in den meisten Fällen eine starke Verzögerung ein, mitunter wurde die Spitze überhaupt nicht erreicht. ROUSCHAL (1940) berichtet über eine Geschwindigkeitsabnahme von 15 auf 6,25 m/Std im Hauptnerv von *Impatiens*-Blättern. Auf die Gründe hierfür wird später eingegangen werden.

Dem Aufenthalt in feuchter Atmosphäre von 4—16 Std vor Farbstoffzufuhr entspricht die Geschwindigkeit der Einwanderung im Hauptnerv, wie sie die Kurve b zeigt. Bei noch längerer Aufbewahrung (bis zu 3 Tagen) bedarf die Versorgung des Hauptnerven immer größerer Zeiträume. Die spitzenwärts und in der Mitte gelegenen Nerven erhalten wenig oder gar keinen Farbstoff mehr, schließlich färben sich lediglich die untersten Nerven an und auch sie nur noch ein kurzes Stück (Kurve c). Dieses Verhalten deckt sich mit den von ROUSCHAL (1940) am Blatt von *Impatiens* gemachten Beobachtungen.

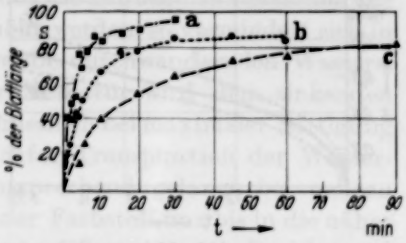



Abb. 10. Die Einwanderung von Aminopyrentrisulfosaurem-Na in den Hauptnerv der *Stellaria*-Blätter nach verschieden langem Aufenthalt der Blätter in einer feuchten Kammer. Kurve *a* Aufenthalt nur wenige Stunden, Kurve *b* 4—16 Std, Kurve *c* längerer Aufenthalt bis zu 3 Tagen

ROUSCHAL fand, daß bei nahezu wassergesättigten Pflanzen Basis und Mittelfeld der Blätter meist zuerst, aber ungleichmäßig versorgt werden und führt diese Erscheinung auf den Öffnungszustand der Stomata zurück. Er gibt aber an, daß er nicht imstande war, eine Beziehung zwischen Ungleichheit der Transpiration und Unterschieden der Spaltaperturen aufzufinden, weil die Infiltrationsmethode zur Erkennung feinster Unterschiede nicht ausreicht: „Auch ich konnte damit keine Ergebnisse finden, die mit der Ungleichheit der — einer entsprechenden Transpiration entspringenden — Wasserversorgung übereingestimmt hätten." Ebenso beobachtete BAUER (1953) bei Blättern im Zustande der Wassersättigung eine Verlangsamung der Farbstoffbewegung.

Die Färbung des Parenchyms begann, entsprechend der Geschwindigkeit der Farbstoffversorgung in Haupt- und Nebennerven, in den einzelnen Zonen zu mehr oder weniger verschiedenen Zeitpunkten. Die Parenchymfelder konnten im basalen Teil schon nahezu durchgefärbt sein, wenn in der oberen Blatthälfte die Farbstoffeinwanderung erst begann. Aber in jedem Falle entspricht die Farbstoffbewegung einem Diffusionsvorgang, wie aus Abb. 11 hervorgeht.

In dieser Kurve sind die Meßergebnisse aller an normalen Blättern durchgeführten Färbungen zusammengefaßt, einschließlich der zum Vergleich angesetzten, unbehandelten Kontrollen bei den Versuchen mit Giften. Die Kurve stellt insofern

auch einen Mittelwert dar für die Farbstoffeinwanderung bei Freiland- und Gewächshausmaterial. Nun braucht aber der Farbstoff bei Freilandmaterial im allgemeinen etwas mehr Zeit, um die Parenchymfelder anzufärben. Bei Gewächshausmaterial ist die Durchfärbung schneller beendet. Die ober- und unterhalb der Mittelwertskurve gezeichneten Kurven geben etwa den Verlauf bei Freiland- und Gewächshaus-Pflanzen wieder. Die Ursache für diese Differenz in der Diffusionsgeschwindigkeit liegt im unterschiedlichen anatomischen Bau (s. Abb. 1a und b). Bei den Sommerblättern aus dem Freiland ist die zurückzulegende Wegstrecke infolge des dichteren Zellverbandes größer als im lockeren Gewebe der Winterblätter aus dem Gewächshaus.

Wie aus Querschnittsbildern und Epidermisabzugspräparaten hervorging, wandert der Farbstoff in unmittelbarer Nähe des Leitbündels von diesem aus in

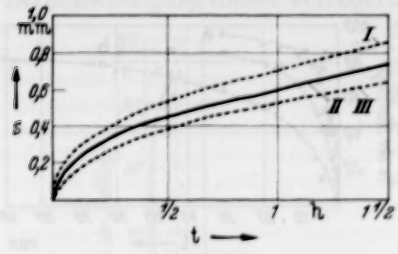



Abb. 11

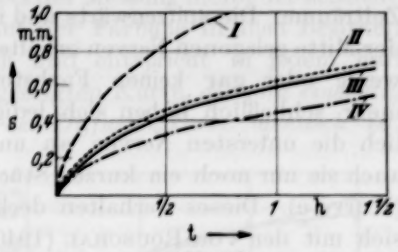



Abb. 12

Abb. 11. Die Einwanderung von Aminopyrentrisulfosaurem-Na von den Nerven in die Zellwände der Epidermis und des Mesophylls von *Stellaria*-Blättern bei ~ 100 % Luftfeuchtigkeit. Kurve *I* Gewächshauspflanzen; Kurve *II* Mittelwerte aus allen Versuchen; Kurve *III* Freilandpflanzen

Abb. 12. Die Einwanderung einiger saurer Fluorochrome in die Zellwände der Blätter von *Stellaria* in Abhängigkeit von der Teilchengröße. *I* K-Fluorescein, $s_{1h} = 1{,}1$ mm; *II* Aminopyrentrisulfosaures-Na, $s_{1h} = 0{,}63$ mm; *III* Brillantsulfoflavin FF, $s_{1h} = 0{,}60$ mm; *IV* Oxypyrentrisulfosaures-Na, $s_{1h} = 0{,}46$ mm

das umliegende Mesophyllgewebe und danach in die darüber gelegene Epidermis ein. Im weiteren Verlauf erscheinen mitunter die Mesophyllzellen um ein geringes früher gefärbt als die Epidermis. Die Versorgung kann aber auch gleichzeitig erfolgen. Eine genaue Entscheidung hierüber ist nicht einfach, da die Herstellung von Blattquerschnitten mit einigen Schwierigkeiten verbunden ist. Werden die Schnitte sehr dünn gemacht, reißt besonders die untere Epidermis leicht ab, die wegen der spärlich verteilten Schwammparenchymzellen recht lose mit den oberen Blattschichten verbunden ist. Dickere Schnitte verlieren an Übersichtlichkeit.

Es muß noch erwähnt werden, daß im Bereich der Anastomosen, in welchen zwei Farbstoffströme aus verschiedenen Richtungen zusammentreffen, der Farbstoff sich schneller auszubreiten scheint. Einerseits erfolgt an diesen Stellen der Übertritt in das Parenchym leichter als von den Seitennerven direkt. Andererseits ist diese Erscheinung ebenso auf einen Überstrahlungseffekt infolge stärkerer Konzentration zurückzuführen, wie bereits bei der Beschreibung der Versuche mit normal transpirierenden Pflanzen erwähnt worden ist.

Unter den gleichen Bedingungen wurde die Einwanderung der Farbstoffe Oxypyrentrisulfosaures-Na, Aminopyrentrisulfosaures-Na, Brillantsulfoflavin FF und K-Fluorescein verfolgt (Abb. 12).

In Analogie zur Diffusion in Gelatine und in den Zellwänden von *Helodea* weisen die Pyrenfarbstoffe und Brillantsulfoflavin FF kaum

Unterschiede in der Wanderungsgeschwindigkeit auf, wohingegen K-Fluorescein auch hier weitaus am schnellsten vordringt.

Die Luftfeuchtigkeit beeinflußt also diesen Ergebnissen zufolge nicht die Geschwindigkeit der Farbstoffausbreitung im Parenchym, sondern wirkt auf die Verteilung im Blatt ein in der Weise, daß nur bei normal transpirierenden Blättern eine gleichmäßige und schnelle Versorgung der ganzen Spreite erfolgt. Bei optimalen Transpirationsverhältnissen ist für die kontinuierliche Durchsetzung des parenchymatischen Gewebes auf dem Wege der Diffusion eine bestimmte Geschwindigkeit der Wasserströmung in den Gefäßen erforderlich. Wird die Transpiration eingeschränkt, wobei nach KLEMM (1956) die Diffusionswiderstände für den Durchtritt der Wassermoleküle erhöht werden, so vermindert sich in der Zeiteinheit die Menge des die Gewebe durchwandernden Wassers. Die Strömungsgeschwindigkeit in der Nervatur wird dem sinkenden Bedarf angepaßt. Sie nimmt ab, bis schließlich bei maximaler Sättigung des Gewebes und weiterhin unterdrückter Transpiration der Wassernachschub ganz unterbleibt. Dementsprechend gelangt bei nahezu oder völlig wassergesättigten Blättern der Farbstoff nur bis in die näher zu den unteren Abschnitten der Hauptgefäße gelegenen Bezirke und vermag auch diese nur unvollkommen anzufärben.

Auf Grund dieser Unterschiede wurden alle weiteren Versuche mit Material ausgeführt, das etwa 2 Std bei 90—95% Luftfeuchtigkeit gehalten worden war, soweit nichts anderes erwähnt wird. Die Anfärbung erfolgt dann ziemlich gleichmäßig über die ganze Blattfläche mit mittlerer Geschwindigkeit, der Spitzenbezirk bleibt in der Versorgung etwas zurück.

Ein Einfluß der Spaltöffnungsweite, wie ihn ROUSCHAL (1940) erwägt, kommt hierbei nicht in Frage. Das Material befand sich längere Zeit vor Versuchsbeginn unter konstanten Bedingungen, die nicht nur Luftfeuchtigkeit und Temperatur betrafen, sondern auch die Lichtverhältnisse einbezogen. Die Blätter wurden immer bei diffusem Tageslicht aufbewahrt. Die Stomata waren durchweg maximal geöffnet. Die Öffnungsweite der Stomata von *Stellaria* ist überhaupt nicht sehr variabel. Eine geringfügige Verengung ist erst durch mehrstündige Belichtung bei leichter Luftbewegung zu erzielen. Völliger Spaltenschluß tritt nur bei nahezu verwelkten Blättern ein. Nach GÄUMANN und JAAG (1937) erfolgt die Öffnung der Stomata und damit die Anpassung an die neuen Transpirationsbedingungen bei hoher Lufttrockenheit drei- bis viermal schneller als bei hoher Luftfeuchtigkeit. Unter den Versuchsbedingungen war daher kaum mit größeren Veränderungen zu rechnen.

**b) Paraffinölbedeckung.** Durch den Aufenthalt des Versuchsmaterials in feuchter Atmosphäre wird die Wasserabgabe an die Atmosphäre nicht augenblicklich gestoppt, sondern es tritt eine allmähliche Abnahme ein. Daneben wird solange Wasser aufgenommen, bis maximale Sättigung des Gewebes erreicht ist. Zu diesem Zeitpunkt ist ein Gleichgewichtszustand in dem System Wasserröhrchen — Blatt — feuchte

Kammer erreicht und nach außen hin ist keine Bewegung mehr festzustellen. Werden die Blätter dagegen mit Paraffinöl bedeckt, so ist jede Wasserabgabe unterbunden, die Aufnahme von Wasser kann aber noch weitergehen. Eine etwaige wasserentziehende Wirkung durch das Paraffinöl kann erst eintreten, wenn dieses infolge Infiltration direkt mit den Zellen in Berührung gekommen ist.

Die Versuche ergaben nun, daß selbst eine kurzfristige Paraffinölbedeckung einen recht gewaltsamen Eingriff bedeutet. Das Paraffinöl dringt sehr schnell in die Blätter ein, nach $1^1/_2$—2 Std ist fast die ganze Luft aus den Intercellularen verdrängt. Die letzten Reste haben sich unterhalb der Spaltöffnungen in den Atemhöhlen gesammelt. Die Geschwindigkeit der Farbstoffausbreitung richtet sich nach dem Sättigungszustand, in welchem sich das Blatt vor Versuchsbeginn befand. Im wassergesättigten Blatt ist also die Farbstoffzufuhr stark gehemmt, wie es für Blätter beschrieben wurde, die sich lange Zeit in wasserdampferfüllter Atmosphäre befanden. Blätter, die nur 2 Std feucht gehalten worden waren, zeigen noch raschen Farbstoffanstieg bis zu $^2/_3$ der Spreitenlänge. Im Parenchym erfolgt die Ausbreitung in gewohnter Weise. Die Blätter wirken bald beschädigt, die Farbstofffront ist verschwommen, die Epidermiszellen beginnen sich teilweise diffus anzufärben und scheinen abzusterben.

**c) Wasserbedeckung.** Die Submergierung erfolgte in der Weise, daß die Mikrokammer auf dem Objektträger mit Wasser gefüllt wurde. Wenn zur Kontrolle Wasser und Deckglas entfernt und das Blatt offen an der Luft liegengelassen wurde, setzte sofort die Farbstoffzufuhr mit der zu erwartenden Stärke ein.

Nach den Untersuchungen von Strugger und Rouschal unterbleibt bei submergierten Pflanzen die Farbstoffeinwanderung. Die eigenen Beobachtungen bestätigten diese Feststellungen im allgemeinen. Jedoch stieg der Farbstoff, wenn auch nur schwach, in einigen Fällen bis in die Seitennerven. Eine Färbung des Parenchyms war, mit einer Ausnahme, nicht zu beobachten. Vergleiche zwischen parallel mit Paraffinöl- und Wasserbedeckung durchgeführten Versuchen ergaben ganz eindeutig eine Hemmung der Farbstoffzufuhr bei den submergierten Blättern.

Dieses Ergebnis leuchtet nicht ohne weiteres ein. Eine völlige Unterdrückung der Transpiration war auch mit Paraffinölbedeckung, eine teilweise in feuchter Luft, erreicht worden. Trotzdem konnte der Farbstoff ziemlich weit in das Blatt hineingelangen. Da die Blätter gleichen Bedingungen unterworfen worden waren, konnten Unterschiede im Sättigungsgrad nicht die Ursache sein. Es mußte einen besonderen Grund für das Ausbleiben jeglicher Farbstoffzufuhr geben. Zur Klärung dieser Frage dienten die im folgenden Abschnitt behandelten Versuche.

**d) Farbstoffaufnahme durch die Spreite.** Die Aufnahme von Wasser und gelösten Substanzen durch die Oberfläche von Assimilationsorganen

ist lange Zeit umstritten gewesen. So lehnte KNY (1886) eine Wasseraufnahme durch die Blattoberfläche von *Stellaria* ab. Er suchte allerdings die Wasseraufnahme auf die Funktion der Stengelhaare als wasseradsorbierende Organe zurückzuführen. Derselben Ansicht war WILLE (1887). Neuere Untersuchungen haben ergeben, daß Wasser imstande ist, von der Oberfläche her in das Blatt einzudringen, wenn die Cuticula benetzbar ist (WETZEL 1924). Es war daher anzunehmen, daß im Falle einer Submergierung das Blatt Wasser durch die Oberfläche aufnimmt, daß also eine Wasserströmung entsteht, die dem normalen Transpirationsstrom entgegengerichtet ist, wie STRUGGER (1939) es für *Helxine soleirolii* beschreibt. Um zu sehen, ob das auch für *Stellaria* zutrifft, wurde folgende Versuchsanordnung getroffen.

α) Aminopyrentrisulfosaures-Na 1:1000 wird der Blattfläche geboten, vom Stiel her wird Leitungswasser zugeführt. Es ergeben sich die in Abb. 13 wiedergegebenen Bilder.

Abb. 13. Die Einwanderung von Aminopyrentrisulfosaurem-Na in die Blattnerven von *Stellaria* durch die Hydathode an der Blattspitze, bei gleichzeitiger Versorgung des Blattes mit Leitungswasser durch den Blattstiel

Intensität und Schnelligkeit der Farbstoffaufnahme sind wieder bedingt durch den Sättigungszustand der Blätter. Trockener gehaltene Objekte nehmen den Farbstoff auch durch die Hydathode begieriger auf als feucht aufbewahrte. Die Ausbreitung von der Spitze her tritt aber kaum in Erscheinung, weil der Wasserstrom vom Stiel her seinerseits mit großer Schnelligkeit im Hauptnerv hochsteigt und die Spitze sehr bald erreicht hat.

Es zeigte sich also, daß bei *Stellaria* lediglich die Epithemhydathode in der Spitze den sauren Farbstoff aufnimmt, von wo aus er als erstes in den großen Randgefäßen vordringt. Gleich danach färbt sich der Hauptnerv an, weiterhin die Seitennerven und schließlich das Parenchym. Wurde die Hydathode durch Bestreichen mit Vaseline abgedeckt, unterblieb jede Anfärbung selbst nach mehrstündiger Einwirkung. An Wundstellen vermochte der Farbstoff in das Blatt einzudringen.

Die Geschwindigkeit der Farbstoffausbreitung in den Blattnerven bei der Einwanderung von der Hydathode her ist gegenüber der normalen Einwanderung verzögert. Sie ist aber höher als im Falle einer Diffusion, so daß hier eine passive Mitnahme mit dem Wasserstrom vorliegen muß. Genaue Messungen waren infolge der gewählten Versuchsanordnung nicht möglich. Die Parenchymfärbung erfolgt schätzungsweise mit der für Aminopyrentrisulfosaures-Na zu erwartenden Diffusionsgeschwindigkeit. Das Färbebild zeigt, wenn das Material zuvor feucht gehalten

worden war, nur schwache Fluorescenz. Blätter, die aus der Gewächshausatmosphäre kamen, nahmen den Farbstoff, wie eben beschrieben, in viel stärkerem Maße auf.

$\beta$) In einer anderen Versuchsreihe wurden den Blättern sowohl vom Stiel als auch von der Spreite her Farbstoffe geboten, die durch verschiedene Fluorescenzfarben gekennzeichnet waren. Es sollte auf diese Weise eine Unterscheidung der Anteile der entgegengesetzt gerichteten Ströme ermöglicht werden.

1. Dem Stiel wird Aminopyrentrisulfosaures-Na geboten, der Blattfläche Aesculin oder Acridinorange.

Dauer der Farbstoffeinwirkung: $^1/_2$, 1, $1^1/_2$ und 2 Std. Ergebnis: Die basischen Fluorochrome sind nach kurzer Zeit von der ganzen Spreite aufgenommen worden. Die Parenchymzellen färben sich allmählich schwach blau (rötlichgelb) an. An den Leitbündelendigungen geht der Farbstoff in die Nervatur über und wird von dort weitergeleitet. Vom Stiel her ist das Aminopyrentrisulfosaure-Na in die Nervatur vorgedrungen, sie hebt sich schwach grün gegen die bläuliche Spreite ab.

Abb. 14. Die Einwanderung von Aminopyrentrisulfosaurem-Na durch die Hydathode an der Blattspitze und von Aesculin durch den Blattstiel in die Nervatur des Blattes von *Stellaria*

2. Dem Stiel wird Aesculin geboten, der Spreite Aminopyrentrisulfosaures-Na (Abb. 14).

Hier ist gut zu erkennen, wie die beiden entgegengesetzten Strömungen das Blatt durchziehen. Das Aesculin dringt im allgemeinen etwas schneller in die Seitennerven ein, wahrscheinlich infolge seiner größeren Diffusionsgeschwindigkeit. Die Bewegung kommt aber in den meisten Fällen bald zum Stillstand, weil die entgegengesetzte Strömung von der Spitze her stärker und anhaltender ist. Diese besitzt auch die größere Antriebskraft, um den Farbstoff in die feinen Seitennerven bis zu den Gefäßendigungen zu leiten. Entsprechend färbt sich das Parenchym überwiegend mit Aminopyrentrisulfosaurem-Na an.

Wenn nach Hülsbruch (1944) Farbstoff und Wasserbewegung voneinander unabhängig wären, müßten sich bei dieser Versuchsanordnung die Farbstoffe vermischen und gemeinsam im Parenchym ausbreiten. Das ist aber nicht der Fall. Die Fluorecsenz beider Farbstoffe ist immerhin so kräftig, daß eine Unterscheidung der Anteile an der Färbung in einem genügend lichtstarken Fluorescenzmikroskop durchaus möglich ist.

Die Versuche wurden mit den beiden Pyrenfarbstoffen wiederholt, die sich am meisten in der Fluorescenzfarbe unterschieden, dem Monomethyl- und dem Dioxy-

pyrendisulfosaurem-Na. Die Beobachtung bestätigte die zuvor erhaltenen Ergebnisse.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß bei einer Submergierung das vollständige Ausbleiben einer Anfärbung des *Stellaria*-Blattes nicht allein auf die Unterdrückung der Transpiration zurückzuführen ist, sondern daß durch einen an Stärke überlegenen oder zumindest gleichwertigen Wasserstrom die Strömung vom Stiel her aufgehoben wird.

Wahrscheinlich wird aber das Wasser von der ganzen Spreite aufgenommen und nicht nur durch die Hydathode. Um aber von der Cuticula bis zu den Gefäßen zu diffundieren, benötigt das Wasser eine bestimmte Zeit, in der der Hydathodenstrom einen großen Teil der Nervatur durchziehen kann. Das von der Spreite her eindringende Wasser wird an allen Stellen gleichzeitig aufgenommen, eine einseitig gerichtete Strömung kann daher nur in den unteren, nahe zum Hauptnerv gelegenen Nervaturbereichen auftreten. Wird außerdem durch den Blattstiel Wasser zugeführt, müssen sich die entgegengesetzten Strömungen aufheben, und es tritt wiederum ein Stillstand in der Wasserbewegung ein.

Als zweites hat sich ergeben, *daß Farbstoff- und Wasserbewegung nicht unabhängig voneinander sind.* Diese Feststellung konnte durch einige weitere Versuche erhärtet werden.

**e) Farbstoffaufnahme durch die Spreite bei Anwesenheit von Rohrzucker.** Es sollte geprüft werden, ob die Farbstoffaufnahme durch die Hydathode von einer osmotischen Saugung beeinflußt werden kann. Zu diesem Zweck erhielten die Farbstofflösungen einen Zusatz von Rohrzucker in den Konzentrationen 0,1 bis 0,9 molar. Die Blätter wurden in die Lösung gebracht ohne Wasserzufuhr vom Stiel her. In keinem Falle unterblieb die Einwanderung in Nervatur und Parenchym.

Parallel mit Rohrzuckerlösungen ohne Farbstoff durchgeführte Versuche ergaben, daß ein merklicher Wasserentzug nur bei den höchsten Konzentrationen 0,8 und 0,9 mol/Liter stattgefunden hatte, und auch hier war eine sichtbare Wirkung erst nach 3 Tagen eingetreten: die Blätter waren verwelkt, ohne daß es zu einer Plasmolyse gekommen wäre. Die in den niedrigeren Konzentrationen gehaltenen Blätter waren nach 5 Tagen noch voll turgescent. Es war also eine osmotische Saugung eingetreten. Aber auch der Austritt der Wassermoleküle geht auf dem Wege der Diffusion vor sich. Eine Strömung entsteht hierbei nicht. Die Diffusion des Farbstoffes wird nicht beeinflußt. Im übrigen kommt hinzu, daß der Wasserentzug so große Zeiträume beansprucht, daß er die nur kurzdauernde Anfärbung nicht beeinflussen kann.

**f) Farbstoffaufnahme aus Gelatine. Gelatineauflage im Bereich der Hydathode.** Werden Farbstoffgelatineplättchen (Aminopyrentrisulfosaures-Na und K-Fluorescein, 1:100 und 1:1000, 25 und 10%ige Gelatine) auf die Spitzenregionen der Blätter gelegt oder die Gelatine in flüssiger Form auf die Hydathode aufgetropft, wo sie dann erstarrt, so entspricht die Geschwindigkeit der Farbstoffausbreitung sowohl in den Gefäßen als auch im Parenchym wassergesättigter Blätter einem Diffusionsvorgang. Nicht wassergesättigte Blätter zeigen keine Aufnahme.

Daraus resultiert, daß *der Farbstoff nicht imstande ist, bei gleichzeitiger Wasserzufuhr durch den Stiel gegen eine Strömung in das Blatt einzuwandern.*

**Seitliche Gelatineauflage.** Wird Farbstoffgelatine an einer Seite des Blattes auf die unbeschädigte Spreite gelegt, so erfolgt keine Einwanderung, wie nach den Ergebnissen mit Farbstofflösung nicht anders zu erwarten war. Wenn dagegen ein kleiner Streifen vom Rand abgeschnitten und die Gelatine an den so entstandenen Wundrand gebracht wird, so diffundiert Farbstoff in die großen Seitennerven ein, aber nur, wenn nicht gleichzeitig Wasser durch den Stiel aufgenommen wird. Auch hier tritt also wieder das gleiche Ergebnis auf, daß der Farbstoff nicht entgegengesetzt zur Wasserbewegung vorzudringen vermag. In ein unbewegtes Medium diffundiert er ein auf Grund des Konzentrationsgefälles.

Eine Ausbreitung im Parenchym war zwar zu erkennen, konnte jedoch wegen der geringen Fluorescenzintensität nicht gemessen werden.

### *2. Farbstoffeinwanderung in vorbehandelte Blätter*

Alle bisher unternommenen Versuche hatten ergeben, daß die Farbstoffeinwanderung in die Zellwände des Parenchyms eine Diffusion ist. Die Diffusionsgeschwindigkeit wird von der Porenweite in den Zellwänden bestimmt. Wenn nun die Ausbreitung in den Membranen nur auf physikalischer Grundlage vor sich geht, so muß daraus geschlossen werden, daß Stoffwechselvorgänge am Zustandekommen der Wasserbewegung nicht beteiligt sind. Narkotica und Stoffwechselgifte dürften daher keinen Einfluß ausüben. Um diese Folgerung zu beweisen, wurden die Blätter einer Behandlung mit einigen der bereits bei *Helodea* verwendeten Hemmstoffe unterworfen.

**Chloroform**[1]. Blätter von *Stellaria* befestigte ich in üblicher Weise auf dem Objektträger ohne Deckglasauflage und brachte sie in ein mit feuchtem Filtrierpapier ausgeschlagenes Glas. Mit einer Pipette wurden wechselnde Mengen Chloroform eingetropft und das Gefäß fest verschlossen. Nach verschieden langer Einwirkungszeit erhielten die Blätter Farbstoff. Für die Dauer der Beobachtung legte ich Deckgläser auf. Zwischen den einzelnen Ablesungen wurden die Objekte wieder in der Chloroformatmosphäre aufbewahrt.

Schmucker (1928) stellte bei narkotisierten Zweigen und Blättern eine Abnahme der Transpiration fest. Er schließt daraus auf eine aktive Wasserausscheidung, die durch Narkose hemmbar ist. Die Hemmwirkung sei besonders deutlich bei erschwerter Wasserabgabe in feuchter unbewegter Luft, unter normalen Bedingungen träte sie nicht so stark in Erscheinung. Er verwendete Chloroform in Konzentrationen von 0,0004—0,02% und Äther von 0,008 und 0,04%. Eine Beeinflussung der Blattsaugung oder Wasserleitung konnte er dagegen nicht einmal mit letal wirkenden Konzentrationen erzielen.

[1] Die benutzten Konzentrationen und die Einwirkungszeiten der Narkotica und Stoffwechselgifte sind auf S. 392 angegeben.

Die Ergebnisse der eigenen Versuche mit Chloroform sind in Abb. 15 zusammengefaßt. Das Kurvenbild zeigt wieder eine normale Diffusion im Parenchym. Interessant war bei der Beobachtung des Färbeverlaufs die Tatsache, daß in einigen Fällen bei Blättern, die an der Spitze durch die Chloroformeinwirkung letal geschädigt waren, in den unterhalb gelegenen parenchymatischen Bereichen durchaus normale Farbstoffeinwanderung erfolgte. Diese Beobachtung ist insofern von Bedeutung, als bei den *Stellaria*-Blättern ein allmähliches Absterben wie bei den *Helodea*-Blättern nicht zu sehen ist. Dort ist das allmähliche Erlöschen der Chlorophyllfluorescenz ein gutes Kriterium für den Grad der Schädigung. Bei *Stellaria* dagegen gibt es im allgemeinen solche Übergänge nicht. Blätter, die bis zu einem Tag bei 0,01% Chloroformatmosphäre aufbewahrt wurden, waren, der Chlorophyllfluorescenz nach zu urteilen, noch völlig gesund und nahmen den Farbstoff in üblicher Weise auf. Dabei hätte nach SCHMUCKER gerade unter diesen Bedingungen (feuchte unbewegte Luft) die Hemmung der aktiven Wasserausscheidung deutlich werden müssen. Bei Konzentrationen von 0,5% an starben die Blätter augenblicklich ab. Sie verloren die Turgescenz, die Chlorophyllfluorescenz erlosch, und es wurde kein Farbstoff aufgenommen.

Abb. 15. Die Einwanderung von Aminopyrentrisulfosaurem-Na in das Blattparenchym von *Stellaria* nach einer Vorbehandlung der Blätter mit Chloroform. Kurve *I* Wintermaterial, Kurve *II* Sommermaterial, gestrichelte Kurven die entsprechenden Diffusionskurven

Versuche mit *Äther* ergaben analoge Ergebnisse.

*Äthylurethan*. Die Urethanlösungen wurden dem Stiel geboten. Dabei mußte mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß das Gift gar nicht bis in die Spreite befördert wird, denn auch hier waren die Schädigungen nicht augenfällig. Aus diesem Grunde wurde einigen Objekten so lange (2—3 Tage) Urethanlösung zugeführt, bis ein Ablassen der Chlorophyllfluorescenz in der näheren Umgebung der Nerven die beginnende Schädigung anzeigte. Die Stiele waren zwischendurch öfter nachgeschnitten worden, damit die Aufnahme nicht durch Beschädigung der Stiele unterbunden wurde. Außerdem waren die Blätter bei $f_r = 80$ bis 85% aufbewahrt worden, um die Transpiration und damit den Wasserstrom nicht völlig zu unterdrücken. Die Einwanderung des Farbstoffes im Hauptnerv erfolgte nur langsam, die Ausbreitung im Parenchym sehr unregelmäßig, aber wieder mit Diffusionsgeschwindigkeit.

Die Verwendung von *KCN* bot Gelegenheit, sowohl den Einfluß in Gasform auf die Spreite als auch in Lösung durch den Stiel zu prüfen.

1. KCN wurde dem Blatt vom Stiel her zugeführt. — Die Objekte steckten etwa 16—17 Std in Mikroväschen, die mit einer $10^{-1}$ mol KCN-Lösung gefüllt waren, und wurden in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Dann erhielten sie Farbstofflösung (Aminopyrentrisulfosaures-Na 1:1000). Nach etwa 3 Std waren der Hauptnerv und die unteren Seitennerven erster Ordnung ein kurzes Stück schwach gefärbt. Die Einwanderung in das Parenchym erfolgte nur an wenigen Stellen des unteren Spreitendrittels, dort aber mit gewohnter Geschwindigkeit. Nur in einigen Fällen war der Blattstiel so schwer geschädigt, daß keine Farbstoffaufnahme mehr stattgefunden hatte. Selbst bei Verwendung so starker Konzentrationen ist also die Farbstoffausbreitung nicht in jedem Fall zu unterbinden. Wurde den Objekten die KCN-Lösung nur kurze Zeit, $^1/_2$—1 Std zugeführt, so ging die Farbstoffeinwanderung in Abhängigkeit vom Sättigungszustand der Blätter vor sich.

2. Die Blattoberfläche wurde dem Einfluß freier Blausäure ausgesetzt. Die dazu benutzten Konzentrationen betrugen 5 und 10 $cm^3$ einer $10^{-1}$ mol Lösung auf 450 $cm^3$ bei einer Einwirkungsdauer von $^1/_2$ und 1 Std.

3. Blätter, die verschieden lange dem Einfluß freier Blausäure ausgesetzt waren, wurden mit Farbstofflösung bedeckt und die Einwanderung durch die Epithemhydathode verfolgt. Alle Versuche ergaben, daß die Einwanderung in das Parenchym durch KCN nicht beeinflußt wird.

*2,4-Dinitrophenol.* Objekte, die starke Konzentrationen erhielten oder auf die die Giftlösung mehrere Stunden eingewirkt hatten, zeigten nur zögernde Anfärbung der Nervatur. Die zunehmende Schädigung des Gewebes war ausnahmsweise gut zu erkennen. Ebenso wie bei *Helodea* wurde die leuchtendrote Chlorophyllfluorescenz milchig trübe, die Zellen erschienen schwach rötlichgelb, woraus zu schließen ist, daß der Farbstoff in das Zellinnere eindiffundiert. Hier ist nun besonders auffällig, daß die Membranwanderung nicht behindert wird, selbst bei Zellen, die einwandfrei geschädigt sind.

**Adenosintriphosphat.** Als letztes wurde dem *Stellaria*-Blatt noch ATP als stoffwechselförderndes Agens zugeführt. Wie schon erwähnt, berichtet Bogen (1953), daß ATP schwer aus wäßrigen Lösungen aufgenommen wird. Es mußte daher mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß das ATP nicht bis in die Zellen gelangt war. Die Ergebnisse mit den Konzentrationen $10^{-1}$, $10^{-3}$, $10^{-5}$ mol/Liter bei einer Einwirkungsdauer von 2, 4 und 16 Std lassen keine Beeinflussung erkennen.

## Besprechung der Ergebnisse

Die Beobachtungen an *Stellaria* haben ebenso wie die an *Helodea* ergeben, daß *die Farbstoffbewegung in den Membranen des Blattparenchyms einem Diffusionsvorgang gleichzusetzen ist.* Die experimentell

ermittelten Kurven sind mit den theoretisch zu erwartenden nahezu identisch. Die errechneten Fehler liegen in einer Größenordnung, nach welcher die Werte als gut gesichert zu bezeichnen sind. Die Unterschiede zwischen den je Zeiteinheit durchwanderten Strecken sind nur geringfügig. Die Abweichung für die Meßwerte bei der Ablesung nach 1 Std beträgt 3,5%, wenn man den Fehler für alle ermittelten Ein-Stunden-Werte errechnet. Das bedeutet, daß diese Unterschiede in der Diffusionsgeschwindigkeit nicht auf die Beeinflussung durch die Versuchsbedingungen zurückzuführen, sondern allein durch die bei biologischen Objekten zu erwartenden Schwankungen bedingt sind.

Gegen Ende der Versuche sinken die gemessenen Werte im Vergleich zu den theoretischen meist etwas ab. Diese Erscheinung ist mit der unterschiedlichen Größe der Parenchymfelder zu erklären. Bei manchen Objekten beträgt die maximal zu durchwandernde Strecke im Höchstfall 0,55—0,60 mm, bei anderen über 0,90 mm. Bei den letzten Ablesungen einer Meßreihe blieb daher in einem Falle, wenn maximale Färbung erreicht war, der niedrige Wert konstant, während im anderen Fall die zurückgelegte Entfernung immer noch größer wurde.

Die unversehrte Blattspreite ist nicht befähigt, saure Farbstoffe (Amino-, Monomethylaminopyrentrisulfosaures-Na) aufzunehmen, basische Farbstoffe (Aesculin, Acridinorange) dringen dagegen leicht ein.

Das Verhalten der Epithemhydathode in der Blattspitze von *Stellaria* bei der Färbung deutet auf eine bevorzugte Wasseraufnahme durch diese hin. Es entsteht ein Wasserstrom, der dem Transpirationsstrom durch den Blattstiel entgegenfließt. Der Anteil beider Wasserströme an der Versorgung richtet sich nach dem Sättigungszustand des Blattes. Bei trockener gehaltenen Blättern tritt der Hydathodenstrom kaum in Erscheinung, denn der Transpirationsstrom durch den Blattstiel überwiegt bei weitem. Seine Stärke nimmt ab, je höher der Sättigungsgrad der Blätter ist, und der Hydathodenstrom erscheint im Verhältnis kräftiger. Bei voll aufgesättigten Blättern hat die Zufuhr vom Stiel bei unterdrückter Transpiration fast aufgehört, aber auch die Intensität des Hydathodenstromes hat nachgelassen.

Bei Farbstoffzufuhr durch die Hydathode erfolgt die Ausbreitung im Parenchym ebenfalls mit Diffusionsgeschwindigkeit. Sie wird durch Blausäure nicht gehemmt.

Wird dem Blatt der Farbstoff in Gelatine über Hydathode oder Wundrand geboten, so entspricht die Geschwindigkeit der Ausbreitung in den Gefäßen größenordnungsmäßig etwa der Diffusion in Gelatine; in Zeiträumen von 3—6 Std werden wenige Millimeter zurückgelegt. Hier entfällt die Beschleunigung durch den Wasserstrom, denn nur Farbstoffmoleküle treten über.

Eine Farbstoffausbreitung entgegen einem Wasserstrom konnte nicht beobachtet werden.

In Übereinstimmung mit der Feststellung, daß die Farbstoffbewegung in den Zellwänden des Blattparenchyms eine einfache Diffusion ist, wird durch Substanzen, die die Lebenstätigkeit des Plasmas hemmen, weder eine Unterdrückung noch eine Verzögerung der Farbstoffausbreitung hervorgerufen. Bei Verwendung sehr hoher Konzentrationen stockt bereits die Versorgung der Gefäße. Solange aber Farbstoff in das Parenchym einwandert, tut er es mit der seiner Teilchengröße entsprechenden Diffusionsgeschwindigkeit.

Daß die Farbstoffbewegung im Parenchym auf der Grundlage der Diffusion vonstatten geht, hat schon Hülsbruch (1944) erwogen. Die Erscheinung, daß bei der Berechnung der Diffusionskonstanten für die Wanderung von Berberinsulfat die C-Werte sowohl bei Diffusion in Gelatine als auch im pflanzlichen Gewebe absinken, erklärt Hülsbruch mit der Adsorption des basischen Berberinsulfates an die Zellwände, was auch ohne Zweifel richtig ist.

Bauer (1953) führt bereits die Farbstoffbewegung auf die beiden Grundvorgänge, Diffusion und Lösungsströmung, zurück.

Zacherl (1956) fand bei Untersuchungen über den Farbstoffanstieg in Moosen, daß diese, soweit sie keinen oder nur einen kleinen Zentralstrang besitzen, keine innere Leitung aufweisen. Die Fluorochrome diffundieren in den Stengel mit einer Geschwindigkeit ein, die der in Gelatine entspricht. Zacherl lehnt daher eine aktive Leitung ab.

Es ist nun die Frage zu erörtern, ob die bei der Farbstoffausbreitung gewonnenen Ergebnisse auf die Wasserbewegung übertragen werden dürfen.

Festgestellt wurde, daß die Bewegung des Farbstoffes nicht unabhängig von der des Wassers verläuft. Es kann also die zu Beginn angeführte Überlegung angewandt werden, wonach aus dem Verhalten des Farbstoffes ein Rückschluß auf das des Wassers möglich ist. Wenn der Farbstoff in den Gefäßen von einem Lösungsstrom transportiert wird und dann in die Zellwände des Parenchyms eindiffundiert, so muß daraus geschlossen werden, daß in den Membranen keine Zugwirkung mehr auf ihn ausgeübt wird, sich also auch die Wassermoleküle nur diffusionsartig fortbewegen. Wie ebenfalls eingangs erwähnt, sind Geschwindigkeit der Farbstoffteilchen und der Wassermoleküle nicht identisch. Wenn also der Farbstoff für die Durchsetzung der Parenchymfelder etwa $1^1/_4$—$1^1/_2$ Std benötigt, so braucht das Wasser wesentlich weniger Zeit. Der Farbstoff tritt erst neu hinzu, das Wasser ist aber von vornherein in allen Geweben vorhanden. Somit sind nur Verschiebungen innerhalb des Zellgefüges nötig. Hier ist nun der plasmatische Anteil der Zellen in die Überlegungen einzubeziehen, denn bei

der Betrachtung der Wasserbewegung kann man nicht Membran und Plasma trennen, die ein organisches Ganzes bilden. Die Leitung des Wassers in den submikroskopischen Capillaren der Zellwände hat schließlich den Zweck, die Zelle mit Wasser und den darin gelösten Stoffen zu versorgen.

Von Kok (1933) ist bereits festgestellt worden, daß der Stofftransport durch parenchymatisches Gewebe auf dem Wege der Diffusion erfolgt, wobei die Transportgeschwindigkeit durch den Protoplasten herabgesetzt wird.

Es sind außerdem Untersuchungen angestellt worden, ob nicht die Wasseraufnahme durch das Plasma einer Diffusion entspricht. So kommt Bochsler (1948) zu dem Ergebnis, daß das Ficksche Diffusionsgesetz auf die Wasserpermeation anwendbar ist. Bachmann (1939) hält es sogar für möglich, daß die Höchstwerte der Wasserpermeation einer freien Diffusion entsprechen. Er fand, allerdings im Gegensatz zu Höfler und Huber (1930), daß das Gesamtplasma im allgemeinen eine hohe Wasserpermeabilität besitzt, die der Grenzschichten dagegen wesentlich geringer ist.

Dem Blattgewebe wird jeweils eine bestimmte Wassermenge durch die Verdunstung entzogen. Daß auch in diesem Falle die daraus resultierende Wasserbewegung nur einer Diffusion gleichkommen kann, zeigen die Ergebnisse von Klemm (1956). Die Wasserabgabe an der Oberfläche entspricht einer Diffusion, und eine Herabsetzung der Wasserabgabe erfolgt durch Erhöhung des Diffusionswiderstandes in den Zellwänden. Das Plasma ist daran nicht beteiligt, wie auch aus den Untersuchungen von Fritz (1956) hervorgeht, wonach der Sättigungswassergehalt auf den Quellungszustand der Zellwände zurückzuführen ist. In die gleiche Richtung sollen wohl die von Butterfass (1956) am Gelatinemodell gemachten Beobachtungen weisen.

Es stellt sich also folgendes Bild der Wasserbewegung im Parenchym dar. Die Wassermoleküle in den Gewebestrukturen befinden sich in regelloser Bewegung. An der Blattoberfläche erfolgt die Abgabe von Wasser an die Atmosphäre auf dem Wege der Diffusion. Dadurch wird ein Konzentrationsgefälle aufrechterhalten, daß von den Leitbündeln bis zur Oberfläche reicht und sowohl das Wandsystem als auch den Inhalt der Zellen umfaßt. Die Diffusionsgeschwindigkeit wird durch die unterschiedliche Größe der Diffusionswiderstände in den Wänden nach Bedarf reguliert. Dieser Regulationsmechanismus bestimmt zugleich die Stärke der fasciculären Leitung. Bei optimalen Transpirationsverhältnissen sind die Diffusionswiderstände in den Membranen relativ klein. Eine regelmäßige Strömung von bestimmter Geschwindigkeit in den Gefäßen ist erforderlich, um den Wasserbedarf zu decken. Sinkt der Verbrauch als Folge eingeschränkter Verdunstung, so vermindert sich

die Zugwirkung auf das Wasser in den Gefäßen. Die Strömung wird langsamer, bis sie schließlich ganz zum Stillstand kommt, wenn das Gewebe wassergesättigt und die Wassergabe unterbunden ist.

Auf Grund der angestellten Betrachtungen ist es wahrscheinlich, daß die Wasserbewegung in den Zellwänden ein Diffusionsvorgang ist, wie es für Farbstoffe bewiesen werden konnte.

## Zusammenfassung

Bei *Helodea densa* als Vertreter der Wasserpflanzen und *Stellaria media* als Vertreter der Landpflanzen wurde die Wanderung saurer Fluorochrome in den Zellwänden des Blattparenchyms beobachtet und durch Ausmessen der zurückgelegten Wegstrecken die Geschwindigkeit bestimmt.

Den *Helodea*-Blättern wurden die Farbstoffe durch eine Gelatineauflage geboten. Dabei befanden sich die Blätter unter Paraffinölabschluß. Die Geschwindigkeit der Ausbreitung hängt von der Teilchengröße ab. Sie ist viel kleiner als bei einer Diffusion in Gelatine.

Narkotica und Stoffwechselgifte bewirken keine Hemmung der Farbstoffbewegung. Sind einzelne Bezirke der Blätter abgestorben, so durchwandern die Fluorochrome die tote Zone diffus und wandern jenseits derselben normal in den Zellwänden weiter.

Das Verhalten der Fluorochrome ändert sich nicht, wenn sie den *Helodea*-Blättern an verschiedenen Stellen (Spitze, Mitte, Basis) oder in verschiedenen Konzentrationen zugeführt werden.

Die Ausbreitung der Fluorochrome in den Zellwänden des *Helodea*-Blattes entspricht einem Diffusionsvorgang.

Den Blättern von *Stellaria* wurde die Farbstofflösung im allgemeinen durch den Stiel geboten. Der Einfluß von Wasserdampfgehalt der Luft und Sättigungszustand des Gewebes wird besonders in der Geschwindigkeit der fasciculären Leitung deutlich. Die Farbstoffeinwanderung in das Parenchym entspricht auch hier dem Diffusionsgesetz.

Stoffwechselgifte beeinflussen auch bei *Stellaria* die Farbstoffausbreitung nicht. Der Farbstoff wandert normal von den Gefäßen aus in die Membranen ein, solange das Blatt nicht letal geschädigt ist.

Wird die Transpiration durch Paraffinölbedeckung unterbunden, so erfolgt die Farbstoffversorgung in Abhängigkeit vom Sättigungszustand des Gewebes. Eine Zugwirkung konnte unter den Versuchsbedingungen nicht festgestellt werden.

Bei Submergierung nehmen die Blätter Wasser durch die Oberfläche und bevorzugt durch die Epithemhydathode in der Blattspitze auf. Es entsteht ein inverser Transpirationsstrom in den Gefäßen. Durch Verwendung verschiedenfarbiger Fluorochrome konnten die Anteile der entgegengesetzt gerichteten Strömungen kenntlich gemacht werden.

Die Versorgung des Parenchyms wird auch bei Farbstoffzufuhr von der Hydathode her nicht durch Blausäure gehemmt.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit ist es wahrscheinlich, daß auch die Wasserbewegung im Parenchym dem Diffusionsgesetz entspricht.

Herrn Prof. Dr. H. Drawert danke ich für die Anregung zu den Untersuchungen.

## Literatur

Bachmann, F.: Zur Analyse von Permeabilitätsmessungen. I. Wasserpermeabilität. Planta (Berl.) **30**, 224 (1939). — Bauer, L.: Über den Wasserhaushalt der Submersen. Protoplasma (Wien) **41**, 178 (1952). — Zur Frage der Stoffbewegungen in der Pflanze mit besonderer Berücksichtigung der Wanderung von Fluorochromen. Planta (Berl.) **42**, 367 (1953). — Beiler, A.: Insertionshöhe und Wassersättigungsmangel der Blätter von *Pisum sativum*. Planta (Berl.) **34**, 125 (1944). — Bochsler, A.: Die Wasserpermeabilität auf Grund des Fickschen Diffusionsgesetzes. Ber. schweiz. bot. Ges. **58**, 73 (1948). — Bogen, H. J.: Beiträge zur Physiologie der nichtosmotischen Wasseraufnahme. Planta (Berl.) **42**, 140 (1953). — Brauner, L., u. M. Hasman: Untersuchungen über die anomale Komponente des osmotischen Potentials lebender Pflanzenzellen. Rev. Fac. Sci. Univ. Istanbul, Sér. B **11**, 1 (1946). — Butterfass, T.: Modellversuche zur Beeinflussung der Diffusion eines Fluorochroms als Anzeiger des Wasserweges in pflanzlichen Kapillaren. Protoplasma (Wien) **47**, 398 (1956). — Coster, C.: Die Geschwindigkeit des Transpirationsstromes. Planta (Berl.) **15**, 540 (1931). — Diehl, J.: Einige Beobachtungen über die Aufnahme von Farbstoffen durch die Blätter von *Helodea canadensis*. Rec. Trav. bot. néerl. **33**, 502 (1936). — Fritz, M.: Über die Aufsättigung abgeschnittener Blätter bei Einstellen in Lösungen von Elektrolyten und Anelektrolyten. Protoplasma (Wien) **46**, 198 (1956). — Gäumann, E., u. O. Jaag: Der Einfluß der Luftfeuchtigkeit auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Spaltöffnungen. Ber. dtsch. bot. Ges. **55**, 236 (1936). — Gessner, F.: a) Wasseraufnahme durch Blätter und Samen. b) Der Wasserhaushalt der Hydrophyten und Helophyten. In W. Ruhland, Handbuch Pflanzenphysiologie, Bd. III. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956. — Gessner, F., u. A. Kaukal: Die Ionenaufnahme submerser Wasserpflanzen in ihrer Abhängigkeit von der Konzentration der Nährlösung. Ber. dtsch. bot. Ges. **65**, 155 (1952). — Huber, B., u. K. Höfler: Die Wasserpermeabilität des Protoplasmas. Jb. wiss. bot. **73**, 351 (1930). — Hülsbruch, M.: Fluorescenzoptische Untersuchungen über den Wasserweg in der Wurzel. Planta (Berl.) **34**, 221 (1944). — Zum extrafascikulären Wasserweg in der Wurzel. Planta (Berl.) **43**, 566 (1954). — Die Wasserleitung im Parenchym. In W. Ruhland, Handbuch Pflanzenphysiologie, Bd. III. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956. — Klemm, G.: Untersuchungen über den Transpirationswiderstand der Mesophyllmembranen und seine Bedeutung als Regulation für die stomatäre Transpiration. Planta (Berl.) **47**, 547 (1956). — Kny, L.: Anpassung der Pflanzen gemäßigter Klimate an die Aufnahme tropfbar flüssigen Wassers durch oberirdische Organe. Ber. dtsch. bot. Ges. **4**, 36 (1886). — Über die Funktion der Haare von *Stellaria media*. Ber. dtsch. bot. Ges. **27**, 532 (1909). — Kok, A. C. A.: Über den Transport körperfremder Stoffe durch parenchymatisches Gewebe. Rec. Trav. bot. néerl. **30**, 23 (1933). — Moder, A.: Beiträge zur protoplasmatischen Anatomie des *Helodea*-Blattes. Protoplasma (Berl.) **16**, 1 (1932). — Münch, E.: Die Stoffbewegungen in der Pflanze. Jena 1930. — Perner, E. S.: Die intravitale Aufnahme und Speicherung sulfosaurer Fluorochrome durch die obere Zwiebelschuppenepidermis von *Allium cepa*. Protoplasma (Wien) **39**, 180 (1950). — Die

intravitale Fluorochromierung junger Blätter von *Helodea densa*. Protoplasma (Wien) 39, 400 (1950). — Rouschal, E.: Fluorescenzoptische Messungen der Geschwindigkeit des Transpirationsstromes an krautigen Pflanzen mit Berücksichtigung der Blattspurleitflächen. Flora (Jena) **134**, 229 (1940). — Rouschal, E., u. S. Strugger: Der fluorescenzoptisch-histochemische Nachweis der kutikulären Rekretion und des Salzweges im Mesophyll. Ber. dtsch. bot. Ges. **58**, 50 (1940). — Ruge, U.: Kritische zell- und entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an den Blattzähnen von *Helodea densa*. Flora (Jena) **134**, 311 (1940). — Schmucker, T.: Über den Einfluß narkotisierender Stoffe auf Transpiration und Wasserleitung. Jb. wiss. Bot. **68**, 771 (1928). — Schumacher, W.: Untersuchungen über die Wanderung des Fluoresceins in den Siebröhren. Jb. wiss. Bot. **77**, 685 (1933). — Untersuchungen über die Wanderung des Fluoresceins in den Haaren von *Cucurbita pepo*. Jb. wiss. Bot. **82**, 507 (1936). — Weitere Untersuchungen über die Wanderung von Farbstoffen in den Siebröhren. Jb. wiss. Bot. **85**, 422 (1937). — Stålfelt, M. G.: Morphologie und Anatomie des Blattes als Transpirationsorgan. In W. Ruhland, Handbuch Pflanzenphysiologie, Bd. III. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956. — Strugger, S.: Fluorescenzmikroskopische Untersuchungen über die Speicherung und Wanderung des Fluoresceinkaliums in pflanzlichen Geweben. Flora (Jena) **132**, 253 (1938). — Die luminiscenzmikroskopische Analyse des Transpirationsstromes in Parenchymen. 1. Die Methode und die ersten Beobachtungen. Flora (Jena) **133**, 56 (1938). — Die luminiscenzmikroskopische Analyse des Transpirationsstromes in Parenchymen. 2. Die Eigenschaften des Berberinsulfates und seine Speicherung durch lebende Zellen. Biol. Zbl. **59**, 409 (1939). — Studien über den Transpirationsstrom im Blatt von *Secale cereale* und *Triticum vulgare*. Z. Bot. **35**, 97 (1940). — Der aufsteigende Saftstrom in der Pflanze. 1. Die Bedeutung der Arbeit Otto Renners für den Ausbau der Kohäsionstheorie. 2. Die Analyse der extrafascikulären Komponente des Saftstromes. Naturwiss. **31**, 181 (1943). — Wetzel, K.: Die Wasseraufnahme der höheren Pflanzen gemäßigter Klimate durch oberirdische Organe. Flora (Jena) **117**, 221 (1924). — Yamaha, G.: Zur Methodik und Theorie der Vitalfärbung pflanzlicher Protoplasten. Bot. Mag. (Tokyo) **51**, 533 (1937). — Zacherl, H.: Physiologische und ökologische Untersuchungen über die innere Wasserleitung bei Laubmoosen. Z. Bot. **44**, 409 (1956). — Ziegenspeck, H.: Fluoroskopische Versuche an Blättern über Leitung, Transpiration und Abscheidung von Wasser. Biol. generalis (Wien) **18**, 254 (1945).

Dr. Eva Schlafke,
Berlin-Dahlem, Pflanzenphysiologisches Institut der Universität,
Königin-Luise-Str. 1/3

Planta, Bd. 50, S. 423—460 (1958)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Marburg a. d. Lahn

# ENTWICKLUNGSGESCHICHTLICHE UND CYTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AM BALKENTAPETUM VON GENTIANA CRUCIATA L. UND IMPATIENS GLANDULIFERA ROYLE*

Von

KURT STEFFEN und WALDTRAUT LANDMANN

Mit 14 Textabbildungen

*(Eingegangen am 27. September 1957)*

## A. Einleitung

Zu den noch offenen Fragen in der Entwicklungsgeschichte der Antheren und Sporangien gehört die Kammerung der Sporangien durch Vertikal- und Horizontalsepten. Diese Tendenz zur sekundären Unterteilung der Sporangien tritt bereits bei fossilen Formen wie *Pleuromeia* auf und ist hier eines der Merkmale, die für die Richtigkeit der von POTONIÉ aufgestellten Reihe: *Sigillaria-Pleuromeia-Nathorstiana-Isoetes* sprechen. Die Kammerung der Sporangien kann, wenn man den spärlichen Angaben in der Literatur glauben darf, durch mehr oder minder funktionslose Zwischenwände (Trabeculae) oder durch ein besonderes Ernährungsgewebe für die Sporen (Tapetum) erfolgen. Dies sogenannte Balkentapetum nimmt unter den bisher bekannt gewordenen Tapetumtypen eine Sonderstellung ein. Über seine Entstehungsgeschichte ist so gut wie nichts bekannt. Die wenigen in der letzten Zeit darüber gemachten Angaben sind verdächtig und ließen eine genaue entwicklungsgeschichtliche Untersuchung wünschenswert erscheinen. Zudem ist das Interesse am Tapetumgewebe in neuester Zeit durch die Untersuchungen über Mitoseanomalien (SCARASCIA 1952, MECHELKE 1952; zusammenfassend GEITLER 1953, 1954) und endomitotische Polyploidisierung (CARNIEL 1952, 1954) wiederbelebt worden (WUNDERLICH 1954, TSCHERMAK-WOESS 1956).

## B. Eigene Untersuchungen

### I. Technik

*Das Material* von *Impatiens glandulifera* ROYLE und von *Gentiana cruciata* L., die sich von den untersuchten Gentiana-Arten als am geeignetsten erwies, stammt aus dem Botanischen Garten der Universität Marburg. (Die Bezeichnung *Impatiens glandulifera* ROYLE ist den Synonymen *Impatiens glanduligera* LINDL. und *Impatiens roylei* WALP. aus Prioritätsgründen vorzuziehen. [LUDWIG 1956].)

*Die Fixierung* der Antheren für entwicklungsgeschichtliche und kernecytologische Untersuchungen erfolgte nach NAWASCHIN, für die qualitative Bestimmung

* Herrn Prof. Dr. P. CLAUSSEN zum 80. Geburtstag gewidmet.

des RNS-Gehaltes nach CARNOY. Zur Darstellung der Proplastiden, Chondriosomen und Sphärosomen wurden 1%ige ungepufferte $OsO_4$-Lösung oder das Gemisch nach REGAUD (ROMEIS 1948) verwendet. Um Artefaktbildung zu verhindern, erfolgten Entwässerung und Einbettung so schnell wie möglich; Temperaturen über 60° C wurden vermieden. (Vgl. auch STRUGGER 1954.)

*Die Schnittdicke* des nach NAWASCHIN und CARNOY fixierten Materials betrug 10 $\mu$, für die Chondriosomenuntersuchung 1—3 $\mu$. Von letzteren wurden nur die 1 $\mu$ dicken Präparate ausgewertet.

*Färbung:* Die Präparate wurden mit Eisenhämatoxylin nach HEIDENHAIN (Entwicklungsgeschichte) und nach FEULGEN (Karyologie), mit Methylgrün-Pyronin nach DARLINGTON-LA COUR 1947 (RNS-, DNS-Gehalt) und mit Säurefuchsin nach ALTMANN (ROMEIS 1948; Proplastiden, Chondriosomen, Sphärosomen) gefärbt. Bei den beiden zuletzt genannten Färbemethoden unterblieb die sonst übliche Formoldampfbehandlung der Präparate. Bei der Methylgrün-Pyroninfärbung wurde zur Differenzierung anstatt des tertiären Butylalkohols Isopropylalkohol verwendet. Für die Säurefuchsinfärbung eigneten sich besonders die Regaud-, weniger gut die $OsO_4$-fixierten Schnitte. Das Primärgranum erscheint nach REGAUD-Fixierung als Aussparung im Proplastidenstroma, nach Fixierung mit Osmiumtetroxyd als dunkelrot gefärbter Körper. Vgl. auch STRUGGERS Ergebnisse bei *Agapanthus* (1954).

*RNS-Nachweis.* Es wurden jeweils ein fermentbehandeltes Präparat derselben Schnittserie (1 mg Ribonuclease/ml aqua bidest., $p_H$ 6,9) und ein Kontrollpräparat (aqua bidest., mit Veronal-Acetat-Puffer auf $p_H$ 6,9 eingestellt) mit Methylgrün-Pyronin gefärbt.

*Optik.* Für die entwicklungsgeschichtlichen Untersuchungen wurde ein Leitz-Mikroskop mit der 1/12 Ölimmersion 1:100 (N. A. 1,30) und dem Okular 6×, für die Kernuntersuchungen das Neofluar 1:100 (N. A. 1,30) von Zeiss mit dem Okular 12× und für die Chondriosomen-Untersuchungen ein Zeiss-Standard-Mikroskop mit dem Neofluar in Verbindung mit dem Okular 15× benutzt. Die Zeichnungen wurden mit der gleichen Optik und dem großen Zeichenapparat nach ABBE hergestellt.

Sämtliche Abbildungen wurden auf photographischem Wege verkleinert.

*Meßmethodik.* Die Berechnung der Volumina der Kerne und Nucleoli erfolgte nach der Inhaltsformel des Ellipsoids $I = 4/3\pi \cdot r_1 \cdot r_2 \cdot r_3$; $r_1$ und $r_2$ wurden mit Hilfe des Mikrometerokulars der Firma Leitz (12,5×) indirekt ermittelt (auf diese Weise wurden auch sämtliche Messungen anderer Strukturen durchgeführt). Der 3. Durchmesser wurde mit der Mikrometerschraube direkt auf 0,1 $\mu$ genau (mit dreimaliger Kontrolle) festgestellt.

## II. Antherenentwicklung

### *Entwicklungsgeschichte*

*Die Bildung des sekundären Archespors* geht bei *Gentiana* von 1—2, bei *Impatiens* stets von 2 primären Archesporzellen pro Loculus aus. Die Richtung der eingeschalteten Wände und die Teilungsfolge sind in den primären Archesporzellen variabel. In jedem Fall determiniert die erste Periklinwand parietale Zelle und Archesporzelle. Die sekundären Archesporzellen beider Objekte teilen sich erst dann, wenn mehrere Wandschichten gebildet worden sind. Teilungsfolge, Wandverlauf und Zahl der Cytokinesen sind in den sekundären Archesporzellen nicht fest-

gelegt. Wegen der niedrigen Zellzahl sind die Verhältnisse bei *Gentiana* (Abb. 1a—d) übersichtlicher als bei *Impatiens* (Abb. 6a—h).

*Die Wandschichten* werden bei *Impatiens* nach der Norm, also in zentrifugaler, bei *Gentiana* meist in zentripetaler Richtung ausgebildet.

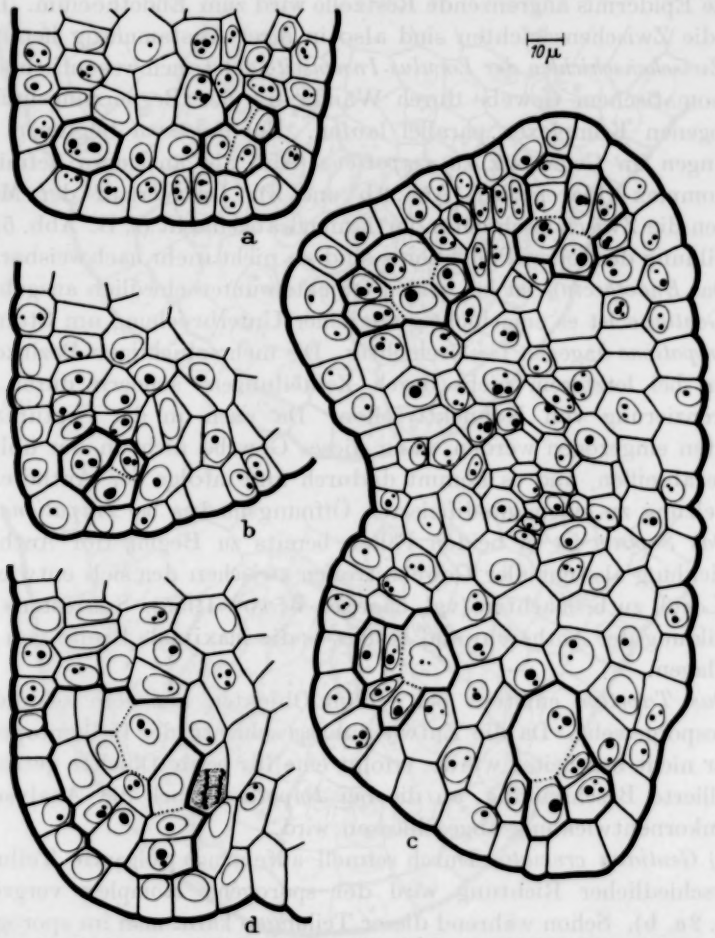



Abb. 1a—d. *Gentiana cruciata* L. Querschnitte durch verschiedene Entwicklungsstadien der jungen Anthere. Die ein bis zwei primären Archesporzellen und die aus ihnen hervorgegangenen Zellkomplexe wurden durch stärkere Umrandung, die erste, die Wandschichten determinierende Periklinwand durch eine punktierte Linie gekennzeichnet. Die erste Antiklinwand, die die Archesporzellen halbiert oder viertelt, wurde durch eine dickere Linie hervorgehoben. Tiefer liegende Kerne wurden punktiert dargestellt. — Weitere Erklärung im Text

Auf das letztere Objekt muß näher eingegangen werden (vgl. dazu das Schema der Abb. 4). Die erste Periklinwand teilt die parietale Zelle in die subepidermale Zelle und die nach innen gelegene erste Zwischenschicht (Abb. 1c, d und 2a, b). Vor Ausbildung der zweiten Periklinen

kann die subepidermale Zelle noch antiklin (Abb. 3 und 4d) geteilt werden. Die zur Differenzierung der zweiten Wandschicht führende perikline Wand wird entweder in der subepidermalen Zelle oder doppelt so häufig in der ersten Zwischenschicht gebildet (Abb. 3 und 4a—c). Die an die Epidermis angrenzende Restzelle wird zum Endothecium. Dieses und die Zwischenschichten sind also in ihrer Abstammung heterogen. *Die Zwischenschichten der Loculus-Innenseite* entstehen wesentlich später aus somatischem Gewebe durch Wände, die der Begrenzungslinie des sporogenen Komplexes parallel laufen. Bei *Gentiana* beginnen diese Teilungen im Gegensatz zu *Impatiens* (Abb. 8h) an einem definierten Zellkomplex (Placentoid) (Abb. 2b und 3). Im Verlauf der Meiosis werden die Zwischenschichten fortlaufend abgeflacht (z. B. Abb. 5); bei Ausbildung des reifen Pollenkorns sind sie nicht mehr nachweisbar.

Das *Endothecium* ist bei beiden Objekten unterschiedlich ausgebildet. Bei *Gentiana* ist es einschichtig mit einer Unterbrechung am Stomium, bei *Impatiens* dagegen 1—3-schichtig. Die mehrschichtigen Bezirke entstehen bei letzterem nicht durch Zellteilungen, sondern durch Umdifferenzierung von Konnektivzellen. Da auch in die Septumzellen Spanten eingezogen werden, kann dieses Gewebe nicht in der üblichen Weise abreißen, und es kommt dadurch und infolge der Antherenverschmelzung zu einem modifizierten Öffnungsmodus bei *Impatiens*.

*Das Septum* ist in beiden Fällen bereits zu Beginn der Antherenentwicklung als schmaler Gewebestreifen zwischen den sich entwickelnden Loculi zu beobachten (vgl. dagegen BÜTOW 1955). Spätestens nach Ausbildung der Antherenwand besitzt es die maximale Breite von 4 bis 5 Zellagen.

*Das Tapetum* entsteht bei beiden Objekten aus dem sekundären Archesporgewebe. Da die Entwicklungsgeschichte des Balkentapetums bisher nicht bearbeitet wurde, erfolgt eine für beide Objekte getrennte, detaillierte Beschreibung, an die bei *Impatiens* noch die Analyse der Pollenkornentwicklung angeschlossen wird.

*a) Gentiana cruciata:* Durch schnell aufeinanderfolgende Teilungen unterschiedlicher Richtung wird der sporogene Komplex vergrößert (Abb. 2a, b). Schon während dieser Teilungen kann man im sporogenen Komplex zwei Zelltypen unterscheiden: die sporogenen Zellen und die Tapetumzellen. Die ersteren sind ausgezeichnet durch homogenes Plasma und einen vergrößerten Ruhekern, dessen Chromatin kompakt, in unregelmäßig geformten Aggregaten und stark färbbar erscheint. Die vier unterschiedlich großen Nucleoli sind im Vergleich zu denen in Kernen steriler Zellen ebenfalls vergrößert. Die sporogenen Zellen sind in einem unregelmäßigen Bogen in der Mitte des Loculus angeordnet (Abb. 3), in jüngeren Stadien noch stellenweise an die äußeren Wandschichten angrenzend (Abb. 2a, b). Im medianen Längsschnitt er-

strecken sie sich als ein mehr oder weniger zusammenhängender, 2 bis 3 Zellen breiter Komplex durch den ganzen Loculus hindurch, vereinzelt aber unterbrochen durch ein- bis zweischichtige Reihen von Zellen des zweiten Typs. Die Zahl der sporogenen Zellen wird nur durch

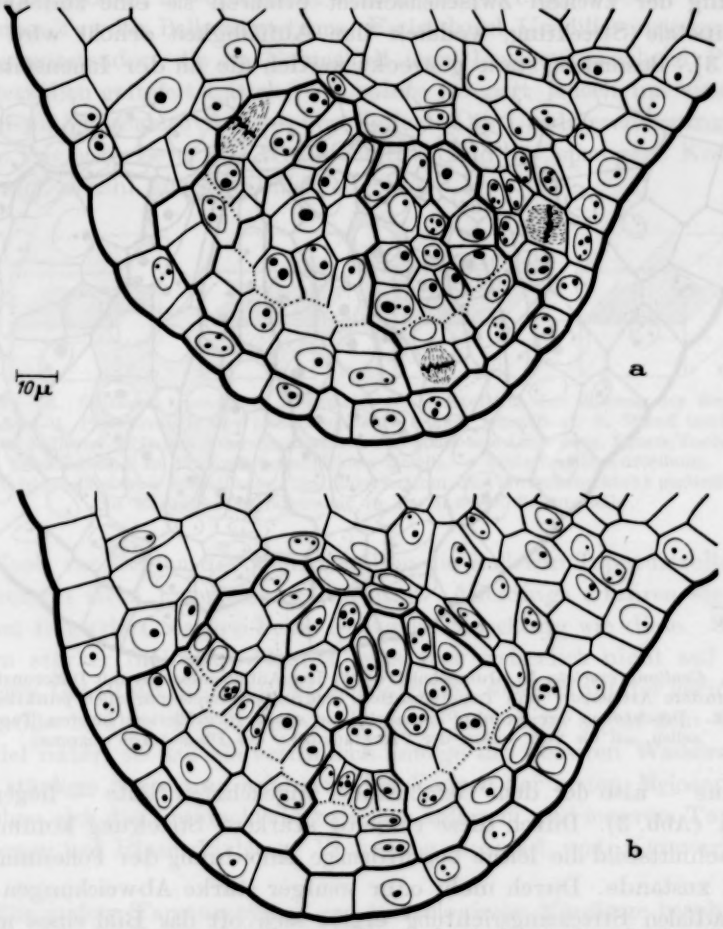



Abb. 2a u. b. *Gentiana cruciata* L. Querschnitte durch den Antherenloculus. Zeichenerklärung s. Abb. 1

vereinzelte Mitosen vermehrt. Nach Abschluß der Teilungen liegen also Pollenmutterzellen vor. — Die oben beschriebene Anordnung der Pollenmutter- und Tapetumzellen im Loculus bleibt bis zu Beginn der Tapetumdegeneration erkennbar (Abb. 5).

Die Zellen des zweiten Typs, des Tapetums, besitzen vacuolisiertes Plasma und einen stark vergrößerten Kern, der durch die lockere Chromatinverteilung auffällt. (Einzelheiten über die Kernstruktur siehe

unter: Cytologie.) Die Tapetumzellen liegen an der Peripherie des sporogenen Komplexes, erstrecken sich aber auch — wie schon erwähnt — als ein- bis zweischichtige Zellreihen von der Außen- zur Innenseite des Loculus durch diesen hindurch (vgl. Abb. 5). Kurz vor der Bildung der zweiten Zwischenschicht erfahren sie eine zunehmende zentripetale Streckung, wodurch ihre Auffälligkeit erhöht wird (vgl. Abb. 3). Besonders stark gestreckt werden die an der Innenseite des

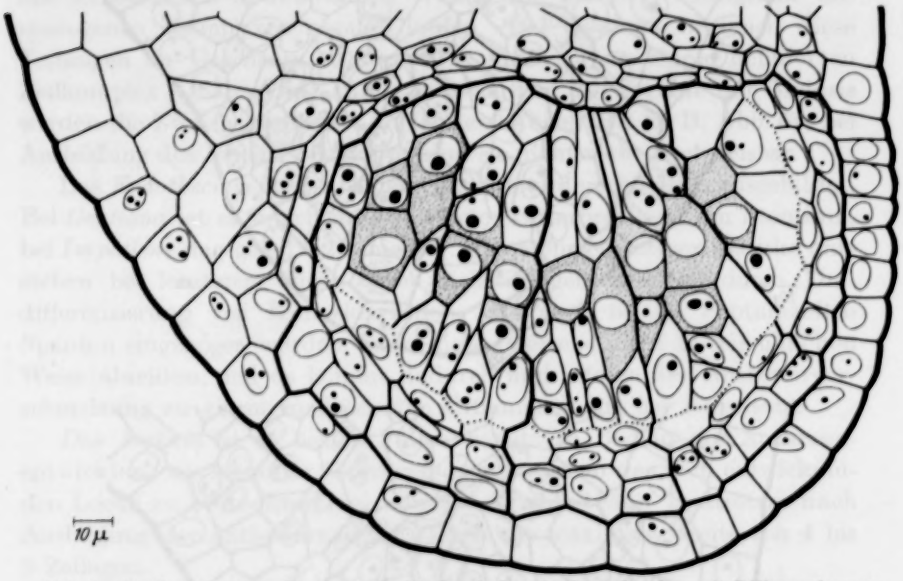



Abb. 3. *Gentiana cruciata* L. Querschnitt durch den Antherenloculus mit Differenzierung in sekundäre Archespor- und Tapetumzellen. Sekundäre Archesporzellen punktiert gezeichnet. Beachte an der Loculus-Innenseite die stark vergrößerten inneren Tapetumzellen, an die von außen der Viererkomplex des Placentoids angrenzt

Loculus — also der dem Gefäßbündel zugekehrten Seite — liegenden Zellen (Abb. 3). Durch diese einseitig stärkere Streckung kommt im Querschnittsbild die leicht bogenförmige Anordnung der Pollenmutterzellen zustande. Durch mehr oder weniger starke Abweichungen von der radialen Streckungsrichtung ergibt sich oft das Bild eines mehrschichtigen Gewebes. An der Loculusinnenseite grenzen die beschriebenen Zellen an einen Komplex von zwei bis vier sterilen Zellen (Abb. 2a, b und 3). Diese Zellen werden sehr früh gebildet, liegen genau in der Mitte der äußeren Begrenzung des sporogenen Komplexes und sind ein wenig in diesen hineinverlagert. Die stärkere Ausbildung des inneren Tapetums bei Vorhandensein eines solchen „Placentoids" (nach CHATIN) wurde verschiedentlich beobachtet (vgl. WUNDERLICH 1954). — Es zeigt sich also, daß bei *Gentiana cruciata* zwischen einem inneren und äußeren Tapetum unterschieden werden muß. Während das innere schon vor

Fertigstellung des Loculus durch seine vergrößerten Zellen und Kerne auffällt, führen die äußeren Tapetumzellen noch die letzten Mitosen durch. Die Zahl der inneren Tapetumzellen wird nicht mehr vermehrt. Da äußeres und inneres Tapetum quer durch den Loculus hindurch durch Zellstränge in Verbindung stehen, entspricht es in seiner Gesamtheit dem Typ des Balkentapetums. Es ist durch Umdifferenzierung von Zellen entstanden, die im Normalfall ihrer Lage entsprechend Pollenmutterzellen geliefert hätten. Als solche fungiert jedoch nur eine verhältnismäßig geringe Anzahl von Zellen. Die Umdifferenzierung geht schon vor sich, bevor die Wandschichten und der sporogene Komplex in ihrer Zellzahl komplett sind.

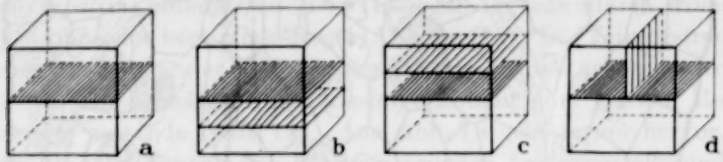



Abb. 4 a—d. *Gentiana cruciata* L. Schematische Darstellung der Bildung der Zwischenschichten. 1. Periklinwand der parietalen Zelle dunkel schraffiert. 2. Wand (anti- oder perikli) heller schraffiert. a Ausgangsstadium. b Zentripetale Aufteilung. Innere Tochterzelle durch Periklinwand in die Zwischenschichten geteilt. c Zentrifugale Aufteilung. Äußere Tochterzelle durch Periklinwand in Endothecium und Zwischenschicht gegliedert. d Verfrühte Antiklinwand in der äußeren Tochterzelle

Noch vor Beginn der Meiosis haben die äußeren Tapetumzellen die inneren in ihrer Entwicklung eingeholt. Allerdings erfahren sie auch in den folgenden Stadien keine so starke Streckung wie diese. Sie besitzen stärker färbbares Plasma, was aber sicherlich nicht auf einen höheren Gehalt an Ribosenucleinsäure (RNS), sondern auf der geringeren Zellgröße beruht. Die Zellen des inneren Tapetums liegen dem Gefäßbündel näher, so daß sie vermutlich infolge der besseren Wasserzufuhr eine stärkere Streckung erfahren. Im Verlauf der ersten Meiosephasen gleichen sich die Unterschiede zwischen äußerem und innerem Tapetum in bezug auf Plasmafärbung, Vacuolisierungsgrad und Kernverhalten aus.

Für andere Tapetumtypen sind karyologische Vorgänge beschrieben worden, die zu einem genetischen Übergewicht dieses Gewebes führen (vgl. das Schema von Carniel 1952, Mechelke 1952 und Tabelle 4). Es blieb zu klären, ob dies auch bei dem abweichenden Tapetumtyp von *Gentiana* der Fall war. In Übereinstimmung mit Carniel 1952 (an *Lupinus regalis*, *Manettia bicolor* und *Helleborus foetidus*) und Rousi (1956) an *Ranunculus*-Arten der *Auricomus*-Gruppe wurde beobachtet, daß zu Beginn der Meiosis Volumen- und Strukturveränderungen in den Tapetumkernen vor sich gehen. Diese Veränderungen beginnen nicht synchron und erfassen auch nicht alle Kerne. Nach Beobachtungen an

Längsschnitten scheint es so, als ob diploid gebliebene Kerne gehäuft in den oberen Loculusspitzen vorkommen. Durch Analyse des Strukturwechsels und Volumenmessungen an den Tapetumzellen konnte der Ablauf eines Endomitosecyclus' nachgewiesen werden. *Gentiana cruciata* besitzt also ein celluläres, einkerniges Tapetum, dessen Kerne auf endomitotischem Wege tetraploid werden.

Bis etwa zur Metaphase I füllen Pollenmutterzellen und Tapetumzellen eng aneinandergepreßt den Loculusraum aus. Im Querschnitt

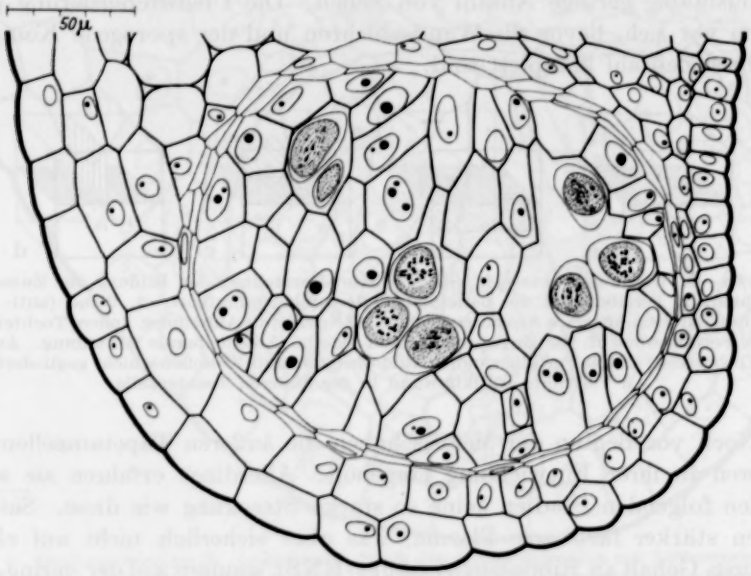



Abb. 5. *Gentiana cruciata* L. Querschnitt durch den Antherenloculus. Pollenmutterzellen in Meiosis. Peripheres und Balkentapetum deutlich. Zwischenschichten z. T. abgeflacht (rechte Bildseite). Im Endothecium noch keine Spantenausbildung. Beachte besonders den kleinzelligen Bezirk des Endotheciums an der rechten Bildseite. Weitere Erklärung im Text

werden Gruppen von 2—8 Pollenmutterzellen von den Tapetumzellen eingeschlossen (vgl. dazu Abb. 3 und 5). Nach Abrundung der Pollenmutterzellen wird besonders deutlich, daß sie fast allseitig von den Zellen des Tapetums umgeben waren (Abb. 5). Bei flüchtiger Betrachtung eines Quer- oder Längsschnittes durch den Loculus könnte man den Eindruck gewinnen, es handele sich um ein amöboides Tapetum. Das Tapetum von *Gentiana cruciata* behält jedoch bis zum Absterben und Obliterieren seine Organisation bei. Die Zellwände sind allerdings sehr dünn und unauffällig. — Bei dem allgemeinen Wachstum der Anthere vergrößern sich auch die Tapetumzellen noch. Nach Freiwerden der Pollenkörner aus dem Tetradenverband beginnt die Degenerationsphase des Tapetums, in der deformierte (langgezogene bis korkzieher-

artig gewundene) Kerne, Zerfall des Chromatins in polyploiden und Pyknose in diploid gebliebenen Kernen zu beobachten sind. Das Plasma der Tapetumzellen ist stark vacuolisiert. — Zum Zeitpunkt des dreizelligen Pollenkorns liegen nur noch Zellfetzen zwischen den Mikrosporen. — Die Pollenkornentwicklung verläuft normal, so daß auf sie nicht näher eingegangen wird.

Zwischen den normalen Mikrosporen wurden vereinzelt leere Hüllen von Zwerg-Pollenkörnern beobachtet. In ihrem Bereich war jedoch das Tapetum im Gegensatz zu den Angaben von Steil (1949/50) nicht verändert. Auch Rousi (1956) fand bei anomaler Pollenkornentwicklung das Tapetum unverändert.

*b) Impatiens glandulifera:* Die Teilungen im sekundären Archespor erfolgen ohne eine bestimmte Regel (Abb. 6e u. f). Die Teilungsfrequenz ist nach Ausbildung der 2—3 Antherenwandschichten größer als vorher. Trotz der unregelmäßigen Teilungsfolge kommt eine gewisse Reihenanordnung zustande (Abb. 7a). Aus Abb. 7a geht ferner hervor, daß jeweils die zum Septum hin gelegene primäre Archesporzelle und ihre Abkömmlinge eine Förderung erfahren. Diese läßt sich vielleicht mit dem von Wardlaw entwickelten Prinzip eines ernährungsphysiologischen Gradienten erklären. Die Zahl der zu passierenden Querwände ist in Richtung auf den geförderten Bezirk am geringsten. — Die Zahl der sekundären Archesporzellen wird im Gegensatz zu *Gentiana* erheblich vermehrt. Nach Abschluß der Zellteilungen differenzieren sich im Archesporkomplex nebeneinander Pollenmutter- und Tapetumzellen. Die Bildung des Tapetums ist also nicht an eine bestimmte Zellteilung oder an eine Teilungsfolge gebunden.

Die beiden Zelltypen sind kenntlich an der unterschiedlichen Intensität der Plasmafärbung und den verschiedenen Kern- und Nucleolengrößen.

Das Kernvolumen der sekundären Archesporzellen (entsprechend dem Stadium 1, quantitativer Teil, Abb. 12a) beträgt $18{,}20 + 2{,}26\,\mu^3$, das Nucleolusvolumen $2{,}52 + 0{,}35\,\mu^3$. Unmittelbar nach der Ausdifferenzierung von Pollenmutter- und Tapetumzellen liegen folgende Zahlenverhältnisse vor:

| Pollenmutterzellen | | Tapetumzellen | |
|---|---|---|---|
| Kern: | $77{,}8 \pm 8{,}38\,\mu^3$ | Kern: | $24{,}03 \pm 3{,}47\,\mu^3$ |
| Nucleolus: | $7{,}06 \pm 0{,}06\,\mu^3$ | Nucleolus: | $1{,}75 \pm 0{,}11\,\mu^3$ |

Die Differenzen der Voluminawerte der Tapetumzellen sind gegenüber denen der sekundären Archesporzellen nicht signifikant (Kern: $p = 18{,}4\,\%$, Nucleolus: $p = 5{,}7\,\%$). Der Vergrößerungsfaktor für die Kerne der Pollenmutterzellen lautet (bezogen auf das Kernvolumen der Tapetumzellen) 3,2, für die Nucleoli 4,0.

Auch für die Chromozentren der Pollenmutterzellen lassen sich Größenveränderungen nachweisen, wie folgende Gegenüberstellung zeigt (Mittelwerte von je 10 Messungen):

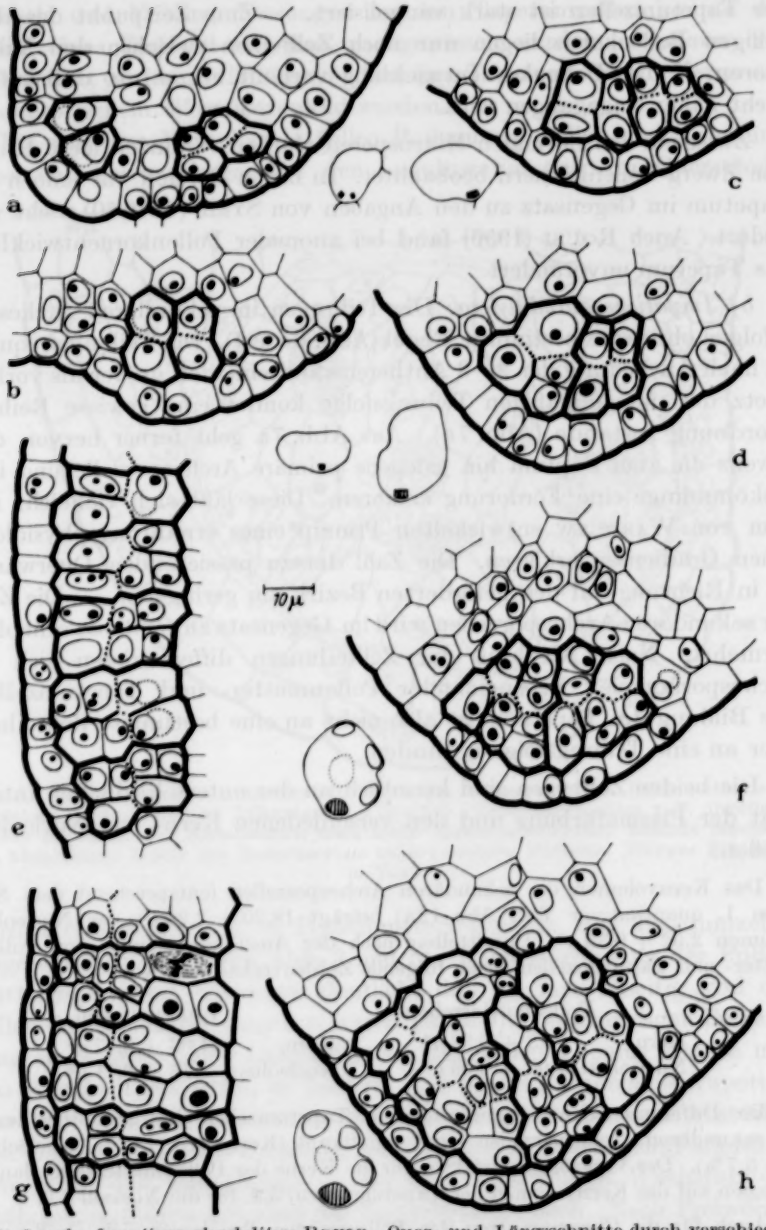



Abb. 6 a—h. *Impatiens glandulifera* ROYLE. Quer- und Längsschnitte durch verschiedene Entwicklungsstadien der jungen Anthere. Die Längsschnitte e und g entsprechen den quergeschnittenen Stadien f und h. Die zellig dargestellten Archesporbezirke werden in den Umrißzeichnungen der Antherenquerschnitte durch Schraffur, der Bezirk des Konnektivleitbündels durch punktierte Umrißlinie gekennzeichnet. Zeichenerklärung s. Abb. 1

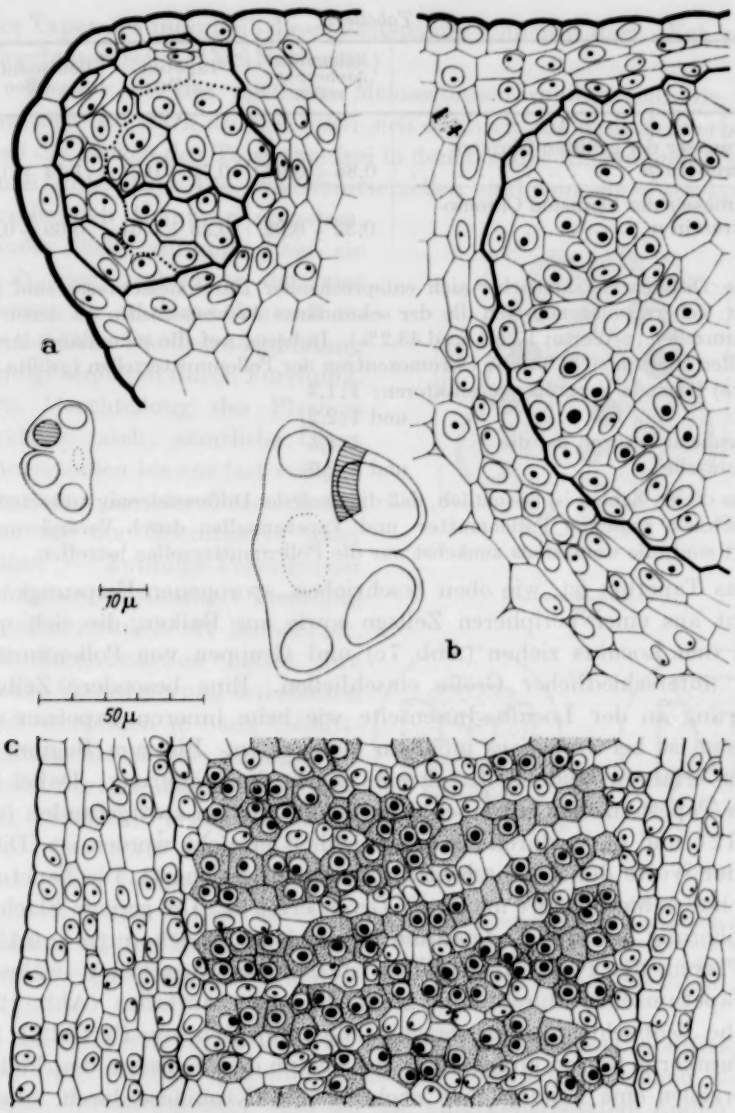



Abb. 7 a—c. *Impatiens glandulifera* ROYLE. Antherenentwicklung bis zur Differenzierung des Balkentapetums. a Querschnitt durch einen Antherenloculus. Beachte an der Innenseite die durch Periklinwände ausgebildeten Zwischenschichten. Diese haben oben und unten noch nicht den Anschluß an die Zwischenschichten des Loculus erreicht. Zeichenerklärung in Abb. 1. b Ausschnitt aus einem quergeschnittenen Antherenloculus. Die sekundären Archesporzellen sind bereits durch größere Nucleoli in ihren Kernen von den Tapetumzellen unterschieden. Die Zwischenschichten umgeben nunmehr den ganzen Loculus. In das Übersichtsschema zu Fig. a ist der dargestellte Loculus-Komplex, in dem Schema zu Fig. b der gezeichnete Ausschnitt durch Schraffierung markiert. c Längsschnitt durch einen Loculus nach Abschluß der Zellteilungen. Die Pollenmutterzellen wurden durch Punktierung gekennzeichnet, zwischen ihnen und am Rande die Tapetumzellen. Die scheinbar vermehrte Zahl der äußeren Wandschichten erklärt sich aus der Schnittführung (linke Bildseite). In den Fig. b und c wurde der sporogene Komplex durch dickere Umrandungen gekennzeichnet. Der 10 $\mu$-Maßstab gehört zu den Fig. a und b, der von 50 $\mu$ zu Fig. c

*Tabelle 1*

| | Sekundäre Archesporzellen | Tapetumzellen | Pollenmutterzellen |
|---|---|---|---|
| Durchmesser der größten Chromozentren in $\mu$ . . . . . | $0{,}86 \pm 0{,}06$ | $0{,}76 \pm 0{,}04$ | $1{,}14 \pm 0{,}04$ |
| Durchmesser der kleinsten Chromozentren in $\mu$ . . . . . | $0{,}32 \pm 0{,}02$ | $0{,}35 \pm 0{,}04$ | $0{,}69 \pm 0{,}05$ |

Die Differenzen sämtlicher sich entsprechender Durchmesserwerte sind sehr gut zu sichern, ausgenommen die der sekundären Archesporzellen zu denen der Tapetumzellen ($p$-Werte: 17,8% und 43,2%). In bezug auf die sekundären Archesporzellen ergaben sich für die Chromozentren der Pollenmutterzellen (größte und kleinste) folgende Vergrößerungsfaktoren: 1:1,3 und 1:2,2, entsprechend bezogen auf die Tapetumzellen: 1:1,5 und 1:2,0.

Aus diesen Zahlen ist ersichtlich, daß die nach der Differenzierung auftretenden Unterschiede zwischen Pollenmutter- und Tapetumzellen durch Veränderungen bedingt sind, die wenigstens zunächst nur die Pollenmutterzellen betreffen.

Das Tapetum ist, wie oben beschrieben, sporogenen Ursprungs. Es besteht aus einer peripheren Zellage sowie aus Balken, die sich quer durch den Loculus ziehen (Abb. 7c) und Gruppen von Pollenmutterzellen unterschiedlicher Größe einschließen. Eine besondere Zellvergrößerung an der Loculus-Innenseite wie beim inneren Tapetum von *Gentiana* ist bei *Impatiens* nicht zu beobachten. Bis zum Beginn der Meiosis erfahren beide Zellarten eine starke Vergrößerung. Dabei hat in den Tapetumzellen ein beschleunigtes Wachstum stattgefunden (vgl. Abb. 12b und c), wodurch Größengleichheit erreicht worden ist (Differenz der Werte der Zellanschnittsgrößen nicht gesichert). Die Tapetumzellen haben hiermit ihre maximale Größe erreicht. Die geringe Flächenvergrößerung bis zum Endstadium läßt sich nicht sichern ($p = 6{,}1\%$). Das Plasma der Pollenmutterzellen ist schwach vacuolisiert, während die Tapetumzellen durch sehr große Vacuolen auffallen (Abb. 12c). (Gleiche Beobachtungen an verschiedenen Objekten von PY 1932.) Die Tapetumkerne führen unmittelbar vor Beginn der Meiosis in den Pollenmutterzellen eine Teilung ohne nachfolgende Cytokinese durch, so daß die Zellen zweikernig werden. Das Volumen dieser Kerne beträgt $33{,}47 \pm 3{,}52\,\mu^3$; der etwas erhöhte Wert stellt keine reelle Volumenzunahme dar, da der Unterschied zum vorher ermittelten nicht signifikant ist ($p = 18{,}4\%$). Das Nucleolusvolumen ist von $1{,}75 \pm 0{,}11\,\mu^3$ auf $3{,}56 \pm 0{,}41\,\mu^3$ ($p = 0{,}12\%$) angewachsen. Diese vergrößerten Nucleoli sind bis zum Zeitpunkt des Freiwerdens der Gonen aus dem Tetradenverband zu beobachten, so daß man, wenn man CASPERSSON folgen will, auf eine gesteigerte Stoffwechselaktivität (Proteinsynthese)

des Tapetums innerhalb dieser Zeitspanne schließen darf. (Vgl. auch die Ergebnisse beim RNS-Nachweis.)

Etwa z. Zt. der mittleren Meiosestadien runden sich die Pollenmutterzellen stark ab und lösen sich dadurch aus dem Zellverband, so daß die Balken des Tapetums frei in den Loculus hineinragen (vgl. dazu auch Abb. 13a). Die Pollenmutterzellen sind von einer stärker lichtbrechenden Membran umgeben, deren Dicke zunimmt, bis sie z. Zt. der Ausbildung der vier Gonen ihr stärkstes Ausmaß erreicht hat. Die Tetradenbildung erfolgt simultan durch Furchung. Die Durchteilung des Plasmas verläuft rasch; sämtliche Übergangsstadien bis zur fast völligen Trennung der vier Gonen finden sich in der Schnittserie einer Blüte. — Zwillings-Pollenkörner infolge unvollständiger Trennung wurden ziemlich oft beobachtet. Die Tapetumzellen haben ihre starke Vacuolisierung beibehalten und erscheinen je nach Schnittrichtung als schmale Stränge oder große, unregelmäßig ovale Zellen mit schmalem Plasmawandbelag. Deswegen trifft man auch die stets dicht beieinanderliegenden Zellkerne nur selten an (Abbildung 13c). Kern- und Nucleolusvolumen sind unverändert geblieben.

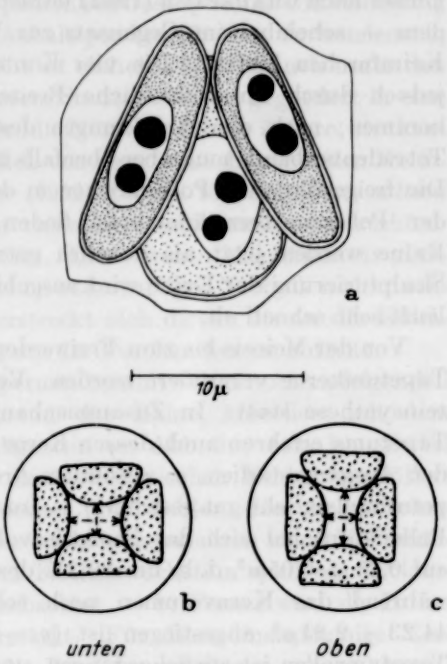



Abb. 8 a—c. *Impatiens glandulifera* ROYLE. Tetradenkonfiguration (abgewandelte isobilaterale Lage). Fig. b und c schematisiert. Die Tetraden befinden sich noch in der Membran der Pollenmutter-Zellen

Die isobilaterale Stellung in der Tetrade ist etwas modifiziert. Je zwei sich diagonal gegenüberstehende Pollenkörner lehnen sich mit einem Pol aneinander, während die entgegengesetzten Enden weiter voneinander entfernt sind. In diesem Raum berühren sich die beiden übrigen, um 90° gedrehten Gonen (Abb. 8b und c). Die Außenfläche eines jeden Pollenkorns ist gerade, während die nach innen gerichtete Fläche sich zur Mitte vorwölbt, Die obere und untere Schmalseite der Pollenkörner ist in diesem Stadium noch abgerundet. Durch diese Anordnung ergeben sich für jedes Pollenkorn vier Berührungspunkte, an denen die Keimfurchen ausgebildet werden. Zunächst scheint es, als ob diese auf der Innenseite liegen müßten (Abb. 8a). Es zeigt sich aber,

daß die eben freigewordenen Pollenkörner, die z. T. sogar noch die vorherige Lage im Tetradenverband erkennen lassen, sofort die flache, viereckige, für das nächste Stadium charakteristische Form annehmen. Dadurch wird die bisher einseitige Vorwölbung ausgeglichen und die Verlagerung der Keimfurchen an die Pollenkornecken erklärbar.

Bei *Impatiens parviflora* und *I. balfourii* sollen die jungen Pollenkörner nach CHADEFAUD (1952) tetraedrisch angeordnet sein (und trotzdem — scheinbar im Gegensatz zur Wodehouseschen Theorie — vier Keimfurchen bilden). Die vier Kontaktpunkte pro Pollenkorn sollen jedoch durch unterschiedliche Breite der Pollenkornenden zustande kommen; nach den Abbildungen des Verf. (Querschnitte durch den Tetradenverband) muß aber ebenfalls isobilaterale Anordnung vorliegen. Die freigewordenen Pollenkörner, in deren Umgebung sich keine Reste der Pollenmutterzellmembran finden, vergrößeren sich; Intine und Exine werden jetzt als deutlich getrennte Membranen sichtbar, die Skulpturierung der Exine wird ausgebildet. Die erste Pollenkornmitose läuft sehr schnell ab.

Von der Meiosis bis zum Freiwerden der Gonen sind die Nucleoli der Tapetumkerne vergrößert worden. Vermutlich findet eine starke Proteinsynthese statt. In Zusammenhang mit dieser aktiven Phase des Tapetums erfahren auch dessen Kerne eine Vergrößerung (Differenz zu den Ausgangsstadien, = sekundäre Archesporzellen oder einkernige Tapetumzellen, sehr gut gesichert). — Im Stadium des jungen zweikernigen Pollenkorns hat sich das Nucleolusvolumen der Tapetumkerne jedoch auf $0{,}38 \pm 0{,}05\,\mu^3$, d. h. um 89,3% des bisherigen Volumens verringert, während das Kernvolumen noch schwach auf einen Endwert von $44{,}23 \pm 2{,}81\,\mu^3$ angestiegen ist ($p = 4{,}3\%$). Die Vacuolisierung der Tapetumzellen ist zurückgegangen, und es sind große Lipoidtropfen in den Zellen zu beobachten. (Vgl. auch die Veränderungen der Proplastiden in diesem Stadium; Abschnitt: Cytologie.) Das Tapetum hat nach der 1. Pollenkornmitose seine Funktion erfüllt und degeneriert, denn wenig später finden sich nur noch Zellreste von ihm, und schließlich ist es nicht mehr nachzuweisen.

Die Pollenkornmitose muß außerordentlich rasch verlaufen. Es gelang nicht, sie unmittelbar zu beobachten. Die junge, eben gebildete generative Zelle liegt der Pollenkorn-Breitseite etwa in der Mitte an. Da sie zart und durchscheinend ist, und ihr Kern und Nucleolus in diesem Stadium schwach färbbar sind, wird sie leicht übersehen. — In einem wenig älteren Stadium (Abb. 13c), verlagert sich die generative Zelle und findet sich am häufigsten an einer der Schmalseiten der Mikrospore. Ihre Form ist elliptisch, bedingt durch die nun freie Lage im vegetativen Plasma. Abplattung infolge Anlagerung an die Pollenkorn-Wand wurde zu diesem Zeitpunkt nur noch in Einzelfällen beobachtet.

Der vegetative Kern liegt immer zentral. Sein Nucleolus ist wenig größer als der des generativen Kernes und zeigt beginnende Vacuolisierung.

Unter den vier Keimsporen, also an den Ecken des Pollenkorns, hat sich das Plasma in Form ovaler Höfe abgehoben (Abb. 13c und 9a,b). Daß diese Räume keine Intineverdickungen darstellen, beweisen unzureichend fixierte Pollenkörner, deren Wandung nur an den betreffenden vier Stellen eingedellt ist. Die phasenkontrastoptische Untersuchung dieser erbrachte ebenfalls keine Anhaltspunkte für das Vorhandensein einer festen Substanz. — Die Intine ist einheitlich dick, auch unter den Keimfurchen. Die Exine ist in diesem Stadium bereits gegliedert in eine innere, nicht strukturierte Lamelle, die Nexine, und die äußere, strukturierte Sexine. Die Nexine ist seitlich von der noch sehr schmalen Keimfurche etwas verdickt. ERDTMAN (1952) konnte für *Impatiens sultani* feststellen, daß die Nexine sich ihrerseits aus zwei Lamellen unterschiedlicher Lichtbrechung zusammensetzt. Diese waren bei *Impatiens glandulifera* wohl infolge der angewandten andersartigen Technik nicht nachweisbar. — Die Skulpturierung erstreckt sich direkt bis an die Keimfurchen, so daß keine Hofbildung um die Furchen herum auftritt.

Nach der Degeneration des Tapetums kommt es nur noch zu folgenden Veränderungen: a) Flächenwachstum der Exine, korreliert mit dem starken Pollenkorn-Wachstum allgemein (s. Abb. 9c; 14a, b). Dabei werden die für das Impatiens-Pollenkorn typischen Felder vergrößert (Abb. 9a—d). Die Begrenzungsleisten der Felder, die im optischen Schnitt als spitzwinkelige Dreiecke erscheinen, erfahren keine Verbreiterung oder Erhöhung. Außer dem Flächenwachstum wird ein Dickenwachstum der Exinemembran beobachtet. — b) Ferner wird die Intine unterhalb jeder Keimfurche verstärkt. Für diese linsenförmige Verdickung wird von HYDE (1955) die Bezeichnung Oncus vorgeschlagen; sie entspricht dem „Zwischenkörper" FRITSCHE's (STEFFEN 1955a, dort weitere Literatur). Die Keimfurchen werden mit zunehmendem Alter noch verbreitert. Vermutlich geschieht dies passiv. Das Pollenkorn vergrößert sich nämlich in der Folge unter Wasseraufnahme, und es entsteht erst jetzt im zweikernigen Pollenkorn eine große, zentrale Vacuole, also zu einem Zeitpunkt, der allen bisherigen Beobachtungen widerspricht. Die richtige chronologische Einordnung dieses Stadiums wird, abgesehen von der bereits vergrößerten generativen Zelle in dem ebenfalls vergrößerten Pollenkorn, durch folgende Tatsachen bestätigt:

1. Die Exine ist im optischen Schnitt breiter (Abb. 9c) als bei dem zuvor beschriebenen Pollenkorn (Abb. 9b): statt rund 0,45 $\mu$ rund 0,65 $\mu$.

2. Die Strukturen der Exineskulptur sind auseinandergerückt (vgl. Abb. 9c mit Fig. b und d).

3. Der Vorgang der Plastidenverkleinerung ist abgeschlossen (s. cytologischen Abschnitt), und sämtliche Plasmapartikel haben jetzt im

Gegensatz zu denen der vorhergehenden Stadien gleiche Form und Größe (Abb. 14a, b).

4. Das Tapetum ist nicht mehr nachweisbar.

Mit der Norm verglichen, müßte die Pollenkornmitose bei *Impatiens* als verfrüht und die Vacuolenbildung als verspätet angesehen werden.

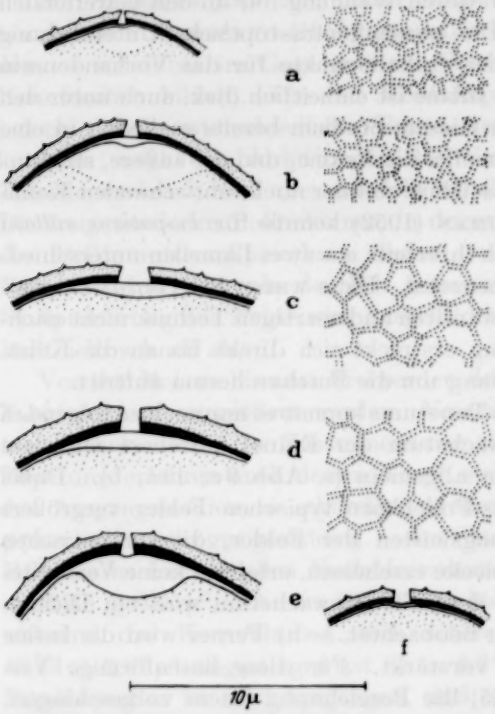



Abb. 9 a—f. *Impatiens glandulifera* ROYLE. Oncusbildung und Exineskulptur. a—d Aufeinanderfolgende Stadien; e u. f: anomale, keimungsunfähige Pollenkörner. Sexine: dicht punktiert, Nexine: schwarz, Intine: weiß, Plasma: schwach punktiert. Die Exinelücke ist die quergeschnittene Keimfurche. Unterhalb dieser ist in den Fig. a u. b das Plasma linsenförmig abgehoben, in c liegt ihr der Oncus an. In den zu den Fig. a—d zugehörigen Aufsichtsbildern wurde die unscharfe Begrenzung der Felder durch Punktierung wiedergegeben

In dem beschriebenen Stadium sind die plasmafreien Höfe unterhalb der Keimfurchen verschwunden, und der Oncus ist deutlich verdickt worden (vgl. Abb. 9a, b mit c).

Das Pollenkorn wird bei seiner weiteren Entwicklung nicht mehr wesentlich vergrößert. Exine (0,9 $\mu$) und Oncus haben ihre definitive Dicke erreicht. In diesem Pollenkorn sind die ersten kleinen Stärkekörner zu beobachten. Die Stärkebildung schreitet allmählich fort, so daß die vegetative Zelle bald vollständig von den großen, dreifach zusammengesetzten Stärkekörnern ausgefüllt ist. Die Proplastiden der generativen Zelle bilden in keinem Stadium Stärke. Generative Zelle und vegetativer Kern sind von der Stärke verdeckt und nur selten auffindbar.

Die generative Zelle ist im stärkehaltigen Pollenkorn langgestreckt und spindelförmig. In ihr liegen die 9 Chromosomen in der aus der Literatur genügend bekannten Reihenanordnung (zuletzt RAGHAVAN, VENKATASUBBAN und WULFF 1939; KHOSHOO 1955, 1956).

Einen Tag vor der Blütenöffnung wird die Stärke rasch abgebaut. Man findet in dem reifen Pollenkorn nur Lipoide. In Übergangsstadien kann man gleichzeitig mit der Verkleinerung der Stärkekörner das Auftreten von Lipoidtropfen beobachten. (Untersuchung von frischem und

$OsO_4$-fixiertem Material.) Die Keimung erfolgt nur als „Fett"pollen. (Über die ökologische Bedeutung der Pollentypen Literatur bei SCHNARF 1941.)

Unter dem reifen Fettpollen finden sich immer in geringer Zahl zwei Sorten von Pollenkörnern, die nicht keimungsfähig sind (STEFFEN 1951).

1. Nicht stärkehaltige und noch viereckige Pollenkörner. Bei diesen ist vor jeder Keimfurche der Oncus *doppelt so stark* wie in normalen Pollenkörnern ausgebildet (Abb. 9e). Das Ausbleiben der Abrundung (Quellung) der Pollenkörner, die vor der Keimung stets stattfindet, deutet darauf hin, daß durch die überstarke Intineverdickung eine Wasseraufnahme unmöglich gemacht wird.

Zwischen den normalen Pollenkörnern fallen 2. die noch stärkehaltigen auf, deren Fermentgarnitur offensichtlich defekt ist. Da sie nur eine dünne Intine und keinen Oncus besitzen (Abb. 9f), dürfte die Fehlentwicklung nicht erst zur Zeit des Stärkeabbaus begonnen, sondern bereits nach der Pollenkornmitose eingesetzt haben. Die vermutlich passiven Vorgänge der Keimfurchenverbreiterung und das Auseinanderrücken der Exineskulptur sind — wie sich zeigt — davon nicht betroffen. Das Pollenkorn von *Impatiens* wird im zweizelligen Zustand verbreitet.

Man kann bei Durchsicht von Pollenschlauchkulturen unterschiedlicher Fixierung und Färbung zu der Ansicht kommen, daß bei den normalen Pollenkörnern der sich bildende Pollenschlauch den unmittelbar vor der Keimfurche gelegenen und ihrer Breite entsprechend großen Bezirk des Oncus vor sich herschiebt. Dann wäre die stark lichtbrechende äußerste Spitze des Pollenschlauches nichts anderes als der Oncus. In gekeimten Pollenkörnern sind jedenfalls an der Austrittsöffnung des Pollenschlauches nur noch die seitlich allmählich flacher werdenden Partien der Intineverdickung zu beobachten, während unter den drei übrigen Keimfurchen der Oncus unverändert ist.

*Cytologie*

**1. Endomitose in den Tapetumzellen von *Gentiana cruciata* L.** *a) Analyse des Strukturwechsels:* Bevor es zu endomitotischen Strukturveränderungen kommt, vergrößern sich die Tapetumkerne auffällig (vgl. Abb. 10a und b). Eine Chromatinvermehrung ist infolge der starken Vergrößerung mit den angewandten Methoden nicht nachweisbar; die Kerne sehen vielmehr im Vergleich zu den Ausgangskernen „leer" aus (Abb. 10b). Das Chromatin ist in kleinen Aggregaten — oft an der Kernmembran liegend — verteilt, und nur selten sind Ketten kleiner Chromomeren quer durch den Kern hindurch zu verfolgen (Abb. 10a). Am Nucleolus sitzen vier SAT-Chromozentren unterschiedlicher Größe. Der Nucleolus ist wohl als Verschmelzungsprodukt der in meristematischen Zellkernen beobachteten vier Nucleoli aufzufassen. Verschmelzung der

SAT-Chromozentren wurde nicht beobachtet. Weniger häufig sind zwei Nucleoli vorhanden, denen dann je nach Größe ein, zwei oder drei SAT-Chromozentren anliegen. Vacuolisierung zeigen die Nucleoli dieser Kernklasse noch nicht. Sie ist aber offensichtlich nicht an einen bestimmten Kernzustand gebunden, denn sie tritt in der Folgezeit völlig willkürlich und in unterschiedlicher Stärke auf. (RESCH 1952 findet dagegen bei *Vicia faba* Vacuolisierung nur in Nucleoli alter Kerne.)

Grobstrukturkern (Interphasekern): Die Grobstrukturkerne von *Gentiana cruciata* sind in allen Geweben und in jeder Polyploidiestufe ausgezeichnet durch lockere Chromozentren mit Chromomerenbau (z. B. Abb. 10d). [„Chromomeren" in Übereinstimmung mit TSCHERMAK-

Abb. 10 a—e. *Gentiana cruciata* L. Endomitosecyclus in den Tapetumkernen. a unveränderter Ausgangskern; b u. d Endo-Interphase 2n und 4n; c Endoprophase (1. Endomitose); d 2. Feinstrukturkern

WOESS und HASITSCHKA (1953) und STEFFEN (1955b), angewendet auf Körnchenstrukturen, deren Beziehung zu den Pachytänchromomeren noch nicht geklärt ist. Zum Problem der Pachytänchromomeren vgl. LINNERT 1955, OEHLKERS u. EBERLE 1957]. Sehr ähnliche Strukturen wie bei *Gentiana cruciata* beschrieben TSCHERMAK-WOESS und HASITSCHKA (1953) für die Trichocytenkerne von *Stratiotes aloides*. Innerhalb der lockeren Chromozentren treten in allen Stadien zwei Strukturelemente auf:

Erstens die größeren und infolgedessen stärker färbbaren Chromomeren (Durchmesser im Mittel = 0,5 µ), die in auffälligen Arealen oft mehrschichtig gelagert sind, jedoch kaum zum Verkleben neigen; zweitens die wegen ihres geringen Durchmessers (im Mittel = 0,2 µ) schwächer angefärbten Chromomeren. Diese bilden einschichtige Bänder und Ketten, welche von den Arealen der großen Chromomeren ausgehen (vgl. Abb. 10a—e). Es liegt kein stichhaltiges Argument vor, wonach man die infolge ihrer Kleinheit weniger intensiv gefärbten Elemente als euchromatisch zu bezeichnen hätte. Außer diesen Chromozentren kommen kompakte SAT-Chromozentren vor. Während die erstgenannten Chromozentren im Kernraum oder an der Peripherie gelagert sind, liegen die vier SAT-Chromozentren dem Nucleolus stets eng an. Sie behalten

Tabelle 2. *Gentiana cruciata L. Volumina der Tapetumkerne*

| | Mittelwert [$\mu^3$] | Zahl der Messungen | $p$-Wert % | Mittelwert bezogen auf Ausgangskern | Mittelwert bezogen auf Interphasekern | Vergrößerungsfaktor | Zuwachs % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ausgangskern 2n . | 53,2 ± 1,64 | 50 | | 1,00 | | | 65,98 |
| Endomitose: Interphasekern 2n . | 88,3 ± 1,95 | 50 | <0,1 | 1,66 | 1,00 | 1,00 | |
| 1. Endomitose . . | 97,5 ± 4,30 | 50 | 0,7 | 1,83 | 1,10 | 1,10 | 15,13 |
| Interphasekern 4n | 149,1 ± 2,80 | 50 | <0,1 | 2,80 | 1,69 | 1,53 | [52,92] |
| 2. Endomitose . . | 192,3 ± 5,64 | 50 | <0,1 | 3,62 | 2,18 | 1,29 | 29,0 |

Tabelle 3. *Gentiana cruciata L. Nucleolusvolumina der Tapetumkerne*

| | Mittelwert [$\mu^3$] | Zahl der Messungen | $p$-Wert % | Mittelwert bezogen auf Ausgangs- und Interphasekern | Vergrößerungsfaktor | Zuwachs % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Ausgangskern 2n . | 3,4 ± 0,19 | 50 | >92,0 | 1,00 | 1,00 | |
| Endomitose: Interphasekern 2n . . | 3,4 ± 0,26 | 50 | | 1,00 | | |
| 1. Endomitose . . | 6,6 ± 0,20 | 50 | <0,1 | 1,94 | 1,94 | 96,97 |
| Interphasekern 4n | 6,7 ± 0,26 | 50 | 76,3 | 1,97 | 1,02 | |
| 2. Endomitose . . | 7,5 ± 0,25 | 50 | 1,6 | 2,20 | 1,12 | 11,94 |

ständig ihre kugelige bis elliptische, gleichmäßige Umrißform. Eine Mehrfachstruktur, wie sie z. B. von STEFFEN (1955b) für *Pedicularis palustris* beschrieben wurde, ließ sich nicht nachweisen.

Es ist unmöglich, bei *Gentiana cruciata* außer Grob- und Feinstrukturkernen noch einzelne endomitotische Teilungsphasen zu unterscheiden, wie sie z. B. TSCHERMAK-WOESS (1954) für *Sauromatum guttatum* beschreibt. Darum wurden zu den Messungen nur charakteristische Kerne dieser beiden Typen herangezogen. Während der Endomitose wird die Zahl und damit auch das Areal der stark färbbaren Chromomeren vergrößert (Abb. 10c, e). Über das Verhalten der kleinen Chromomeren lassen sich keine sicheren Aussagen machen. — Formveränderungen konnten an keiner Chromomerenart beobachtet werden.

Am Nucleolus und an den SAT-Chromozentren lassen sich außer Größenzunahme und eventuell auftretenden Nucleolusvacuolen keine Veränderungen feststellen. Auch CZEIKA (1957) konnte bei Sukkulenten keine Zerlegung der SAT-Chromozentren beobachten.

Feinstrukturkern: An diesem Kerntyp fällt zunächst die Vergrößerung des Nucleolus und der SAT-Chromozentren um das Doppelte auf, wie man aus dem Vergleich der Figuren von Abb. 10 und aus Tabelle 3

entnimmt. Die Chromozentren flachen sich ab und lagern sich hauptsächlich peripher in unregelmäßigen Arealen. Die Größe der Chromomeren verändert sich nicht. Allerdings erscheinen jetzt die schwach gefärbten Chromomeren weniger scharf konturiert als im Grobstrukturkern.

Im vorliegenden Fall ist es nicht möglich, das Zerstäubungsstadium der diploiden Mitosen und das mittlere Endomitosestadium gleichzusetzen (wie bei TSCHERMAK-WOESS und HASITSCHKA 1953, DOLEŽAL und TSCHERMAK-WOESS 1955 geschehen). Im mitotischen Kern von *Gentiana* sind alle Chromomeren gleich groß und gleich in ihrer Färbungsintensität. Darum erscheint der Prophasekern viel dunkler und einheitlicher als ein Feinstrukturkern, der wegen Arealbildung und der z. T. blaß gefärbten Chromomeren durchsichtig wirkt. Die Abstände der Chromomeren voneinander sind im mitotischen Kern geringer.

*b) Bestimmung des Polyploidiegrades.* Für die Volumenbestimmung an den Tapetumkernen von *Gentiana cruciata* war es leider unumgänglich, Kerne aus verschiedenen Knospenschnittserien zu den Messungen heranzuziehen. Damit erhöht sich die Streuung der Werte. — Durch das geringe Kernvolumen bedingt, liegen die einzelnen Größenklassen sehr nahe beieinander und überlagern sich sogar. Aus diesem Grund wurde bei der graphischen Darstellung die plastische Wiedergabe gewählt (Abb. 11). Die Zuordnung der Kerne zu den einzelnen Größenklassen könnte angezweifelt werden. Die Kerne der Grobstrukturklassen lassen sich aber wegen ihrer strukturellen Verschiedenheiten (wie oben beschrieben) sicher voneinander unterscheiden (s. Abb. 10b und d!), so daß kein Zweifel besteht, daß die angegebene Anordnung — unter Einschluß der üblichen Fehlermöglichkeiten — den Tatsachen entspricht. Anders ist es bei den Feinstrukturkernen, deren Strukturen sich gleichen. Hierzu ist zu sagen, daß die Meßwerte der einzelnen Größenklassen jeweils aus anderen Schnittserien stammen, so daß die Überlappungen mit ziemlicher Wahrscheinlichkeit auf der üblichen Streuung beruhen dürften.

Die Vergrößerung der Tapetumkerne vor Beginn der Endomitose ist beträchtlich, sie beträgt 65,98% des Volumens der Ausgangskerne (Tabelle 2 und 3). Sie wird allerdings nicht von einer Volumenzunahme des Nucleolus begleitet, wie dies von STEFFEN (1955b) erstmalig für die Endothelkerne von *Pedicularis palustris* beschrieben worden ist.

Der Verlauf der Endomitose ist in den Tabellen 2, 3 und der graphischen Darstellung wiedergegeben. Es ergeben sich zwei Grob- und zwei Feinstrukturklassen, was bedeutet, daß die endomitotische Polyploidisierung nicht mit einem Interphasekern wie üblich abschließt. Trotz der Überlagerung der einzelnen Größenklassen wird deutlich, daß die Volumina der Feinstrukturkerne sich zwischen die der Grobstrukturkerne gruppieren (Abb. 11).

Beim Übergang der Grobstrukturkerne in das erste endomitotische Teilungsstadium kommt es zu einem Kernzuwachs von 15,13% des Gesamtzuwachses in diesem ersten Endomitosecyclus. Dagegen wächst jetzt das Nucleolusvolumen an und zwar um 97% des Gesamtzuwachses,

d. h. das Nucleolusvolumen verdoppelt sich beinahe. Ganz analog verhalten sich die SAT-Chromozentren: ihr Durchmesser vergrößert sich von 0,4 auf 0,8 $\mu$ im Mittel. Der Nucleolus hat damit sein größtes Ausmaß bereits erreicht, denn beim nächsten Übergang vom Grob- zum Feinstrukturkern (Abb. 10, d zu e) findet keine Vergrößerung mehr statt. Dieses Verhalten steht im Gegensatz zu dem im ersten Endomitoseschritt, wo ja die entscheidende Volumenzunahme erfolgte. Im Gegensatz zu anderen Beobachtungen enden die endomitotischen Strukturbilder in diesem Fall mit einem Feinstrukturkern. Wenn man mit GEITLER (1955) annimmt, daß im Endo-Interphasekern die Chromatinvermehrung und im Endo-Prophasekern nur die Verteilung erfolgt, müßte der Feinstrukturkern als der Abschluß eines Endomitoseschrittes angesehen werden (STEFFEN 1956a).

Die Differenzen der Voluminawerte der Kerne sind einmal genügend, sonst sehr gut zu sichern. — Für die Nucleoli ist die Differenz zwischen erster Grob- und erster Feinstruktur ebenfalls signifikant.

Vergleicht man die Vergrößerungsfaktoren der Kern- und Nucleolusvolumina in den einzelnen Stadien, so ergibt sich eine zeitliche Verschiebung der Vergrößerungsmaxima.

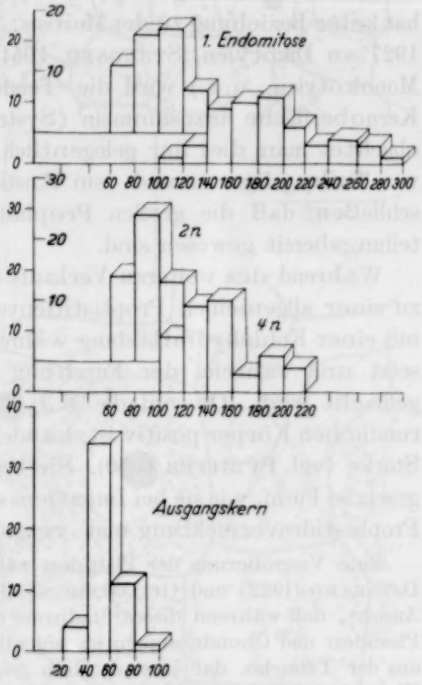



Abb. 11. *Gentiana cruciata* L. Graphische Darstellung der während der Endomitose im Tapetum auftretenden Kerngrößenklassen. Abszisse: Volumeneinheiten von je 20 $\mu^3$. Ordinate: Anzahl der den einzelnen Volumeneinheiten zugehörenden Kerne. Linke Zahlenreihe für die untere, rechte Zahlenreihe für die obere Säulenkolonne

Der Vergrößerungsfaktor für die Tapetumkerne beträgt — wie aus den Tabellen ersichtlich — 1,69, für die Nucleoli 1,97.

**2. Plastiden, Chondriosomen und Sphärosomen.** *Morphologische Veränderungen der Organelle während der Antherenentwicklung.* In den sekundären Archesporzellen und den aus ihnen entstandenen Pollenmutter- und Tapetumzellen sind die Plasmapartikel zufallsgemäß verteilt. — In den Tapetumzellen treten auch nach der freien Kernteilung keine Größenveränderungen der Plasmapartikel ein. BOWEN (1929) beobachtete zwar in mehrkernigen Zellen größere Plastiden als in einkernigen,

bezeichnet aber den (möglichen) Unterschied als „not striking". (Auch aus seinen Abbildungen ist ein solcher nicht zu ersehen.) —

In den Pollenmutterzellen kommen zu Beginn der Reifeteilung verschieden große Proplastiden vor; die größeren liegen häufig in kleinen Gruppen beieinander (Abb. 12c), so daß sie stärker auffallen, als die kleinen verstreut liegenden. Die Art der Lagerung innerhalb der Zelle hat keine Beziehung zu der Meiosis. Von einigen Autoren (z. B. Wagner 1927 an Dikotylen, Strugger 1954 an *Agapanthus*, Sorokin 1955 an Monokotylen, u. a.) wird die Tendenz der Proplastiden, sich an der Kernoberfläche anzusammeln (Systrophe), erwähnt. Bei *Impatiens* beobachtet man dies nur gelegentlich im Tapetum. Aus dem Auftreten von Teilungsfiguren und dem Anstieg der Proplastidenzahl kann man schließen, daß die großen Proplastiden zu Beginn der Meiosis noch teilungsbereit gewesen sind.

Während des weiteren Verlaufs der Meiosis kommt es dann jedoch zu einer allgemeinen Proplastidenvergrößerung, die in Zusammenhang mit einer Kohlehydratbildung während der heterotypischen Teilung einsetzt und während der Furchung der Pollenmutterzellen rückgängig gemacht wird. Obwohl die $KJ_3$-Reaktion der stark lichtbrechenden, rundlichen Körper positiv ist, handelt es sich vermutlich nicht um echte Stärke (vgl. Pfeiffer 1950). Sie besitzen nicht die dreifach zusammengesetzte Form, wie sie bei Impatiens stets vorkommt. — Die Vorgänge der Proplastidenvermehrung und -vergrößerung laufen zeitlich getrennt ab.

Eine Vergrößerung der Plastiden während der Meiosis wurde von Py (1932), Dangeard (1922) und Guilliermond (1924) beobachtet. Letzterer kam zu der Ansicht, daß während dieses Stadiums eine Differenzierung des Chondrioms in Plastiden und Chondriosomen im eigentlichen Sinne stattfindet. Er schloß dies aus der Tatsache, daß jetzt deutlich größenverschiedene Zellorganelle auftraten. Wahrscheinlich hat er die Proplastidenvergrößerung beobachtet. — Von Reservestoffbildung zu diesem Zeitpunkt sprechen auch Wagner (1915) und Py (1932). Krupko (1927) bezeichnet diesen Vorgang als 1., die Stärkebildung der Pollenkörner nach Ausbildung der generativen Zelle als 2. aktive Phase der Plastiden.

Im Tapetum dieses Stadiums sind Chondriosomen, Sphärosomen sowie Proplastiden in den zusammenhängenden Plasmapartien gleichmäßig verteilt. Die Proplastiden und ihre Grana sind vergrößert (vgl. Abb. 12c und 13a); sie sind statt 0,3—0,4 jetzt 0,4—0,6$\mu$ groß. Die Größe der Chondriosomen und Sphärosomen ist in generativem und vegetativem Plasma gleich.

In den jungen Tetradenzellen beginnt eine Proplastidenverkleinerung, die noch während des jungen zweizelligen Pollenkornstadiums andauert, wodurch die Sphärosomen, Chondriosomen und Proplastiden größengleich werden. Zunächst sind jedoch noch verschieden große Proplastiden vorhanden; die großen befinden sich vorwiegend in Kernnähe, während die kleinen ebenso wie die Chondriosomen und Sphärosomen gleichmäßig über den ganzen Plasmaraum verteilt sind. Im Plasma der

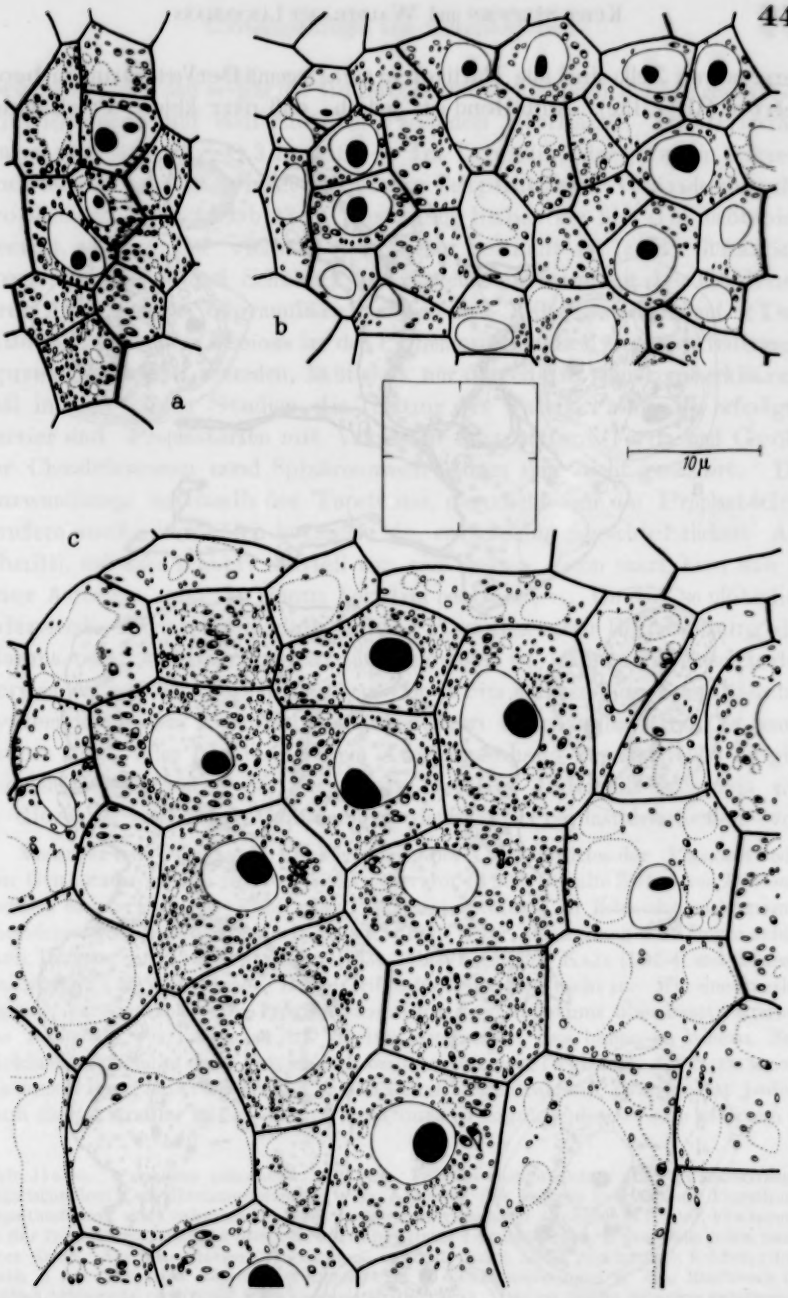



Abb. 12a—c. *Impatiens glandulifera* ROYLE. Ausschnitte aus den Loculi verschieden alter, bei der quantitativen Auswertung berücksichtigter Antheren. Regaud-Fixierung; Säurefuchsinfärbung nach ALTMANN. a Sekundäre Archesporzellen (Stadium 1), b Pollenmutterzellen (große Kerne und Nucleoli) und einkernige Tapetumzellen (Stadium 2), c Pollenmutterzellen zu Beginn der Meiosis, Tapetumzellen zweikernig (Stadium 3). Das Primärgranum der Proplastiden schwarz; Vacuolen punktiert. Neben dem Maßstab die zu Zählungen benutzte Flächeneinheit

generativen Zelle sind alle Partikel in zufallsgemäßer Verteilung zu beobachten (Abb. 13c). Auffallend ist jedoch, daß nur kleine Proplastiden

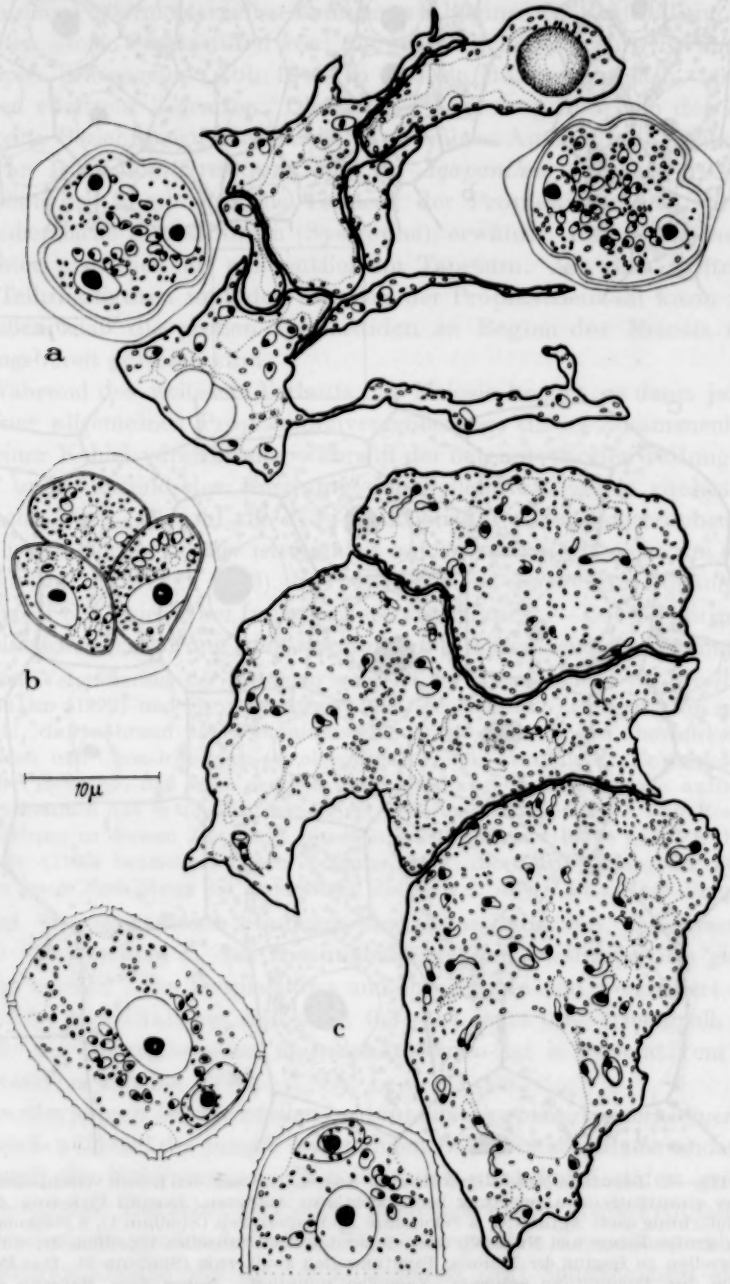



Abb. 13a—c. (Unterschrift s. S. 447)

vorkommen; es sind sogar die im Durchschnitt kleinsten der im gesamten Entwicklungsablauf auftretenden Plastiden überhaupt. Ihre Primärgrana sind nur 0,2—0,3 $\mu$ groß. — Im Tapetum, das jetzt in seinem Endstadium vorliegt, findet zu diesem Zeitpunkt eine Veränderung der Proplastiden statt (Abb. 13c). Erstmalig haben sie hier die amöboide Gestalt, wie sie von vielen Arbeiten her bekannt ist (z. B. GUILLIERMOND; STRUGGER und Schüler). In Übereinstimmung mit der Erhöhung ihrer Anzahl treten bigranuläre Formen und Teilungsstadien auf. (Daß außer zu Beginn der Meiosis in den Pollenmutterzellen nirgends Teilungsfiguren beobachtet wurden, läßt sich nur durch die Annahme erklären, daß in allen diesen Stadien die Teilung der Partikel schneller erfolgt). Ferner sind Proplastiden mit Vakuolen anzutreffen. Form und Größe der Chondriosomen und Sphärosomen haben sich nicht geändert. Die Umwandlung innerhalb des Tapetums, die nicht nur die Proplastiden, sondern auch die Zellen betreffen (s. entwicklungsgeschichtlichen Abschnitt), müssen relativ schnell vor sich gehen, denn man kann sie in einer Anthere, sogar in einem Loculus beobachten. Ob die so plötzlich auftretende Formveränderlichkeit der Plastiden einer Herabsetzung der Plasma- oder Stromaviscosität zuzuschreiben ist, kann nicht entschieden werden, da an den Chondriosomen, die ja ein empfindliches osmotisches System darstellen, keinerlei Veränderungen festzustellen sind. Es muß darum auch offen bleiben, ob ein Zusammenhang zur zweifellos beginnenden Degeneration des Tapetums besteht. Jedenfalls kommen nur in diesem letzten Tapetumstadium derartige Proplastidenformen vor.

Verlängerung und damit Verkleinerung des Querschnittes der Plastiden wird von GUILLIERMOND, MANGENOT und PLANTEFOL (1933) für alte Zellen von *Ricinus*-wurzeln beschrieben. — Zieht man Fixierungsartefakte in Betracht, so kommen Chondriosomenverquellung nach NOACK (1921) oder Abkugelung der Proplastiden nach PERNER und PFEFFERKORN (1953), GRAVE (1955), KAJA (1954) und FASSE-FRANZISKET (1955) in Frage. Beides trifft für *Impatiens* nicht zu. Für eine pathologische Veränderung der Proplastiden (und des Tapetums überhaupt) spricht das Auftreten von Vacuolen im Proplastidenstroma, das bisher in keinem Entwicklungszustand an den Plastiden zu beobachten war. (Vgl. auch GUILLIERMOND, MANGENOT und PLANTEFOL 1933, S. 1033 über Degeneration). Zwingend ist jedoch auch diese Annahme nicht, da von STRUGGER in ergrünenden — also intakten —

Abb. 13 a—c. *Impatiens glandulifera* ROYLE. Pollenkornentwicklung mit den zugehörigen Tapetumzellen. a Pollenmutterzellen nach Abschluß der Meiosis kurz vor der Furchung. Tapetumzellen stark vakuolisiert und unregelmäßig geformt (Stadium 4). $OsO_4$-Fixierung. In der Tapetumzelle rechts oben ein angeschnittener Lipoidtropfen, in der Zelle links unten zwei Kerne. In der rechten Gonengruppe sind die noch nicht abgebauten Kohlehydratreste in den Plastiden schraffiert dargestellt. b Tetradenverband in der Membran der Pollenmutterzelle (Stadium 5: einkerniges Pollenkorn). Das zu diesem Stadium gehörende, nicht dargestellte Tapetum entspricht dem der Fig. a. $OsO_4$-Fixierung. c Junges zweikerniges Pollenkorn; Tapetum im Endzustand (Stadium 6). Regaud-Fixierung. Beachte die Größenunterschiede der Proplastiden in der generativen und vegetativen Zelle! In der unteren Tapetumzelle ist die durch punktierte Umrißlinie gezeichnete große Aussparung durch einen herausgelösten Lipoidtropfen verursacht. — In den Proplastiden sind die Vacuolen durch eine kontinuierliche Linie gekennzeichnet. — In den Pollenkörnern wurde auf eine differenzierte Darstellung der Pollenmembran verzichtet.

Proplastiden gelegentlich Vacuolen und von DRAWERT (1954) „reversible Entmischungsvakuolen" beobachtet wurden. FASSE-FRANZISKET (1955) fand bei *Agapanthus*, daß während der Ausbildung der multigranulären Proplastiden Vacuolenbildung in diesen auftritt, die mit der größten wachstumsphysiologischen Leistung der Plastiden zusammenfällt. Deswegen läßt nach Ansicht der Verfn. das Auftreten von Vacuolen auf Intensivierung der Stoffwechselprozesse schließen. Dies auf Proplastiden von kurz vor der Degeneration stehenden Zellen übertragen zu wollen, erscheint gewagt.

Im vacuolenhaltigen Pollenkorn ist, wie schon im entwicklungsgeschichtlichen Teil erwähnt werden mußte, die bereits im einkernigen

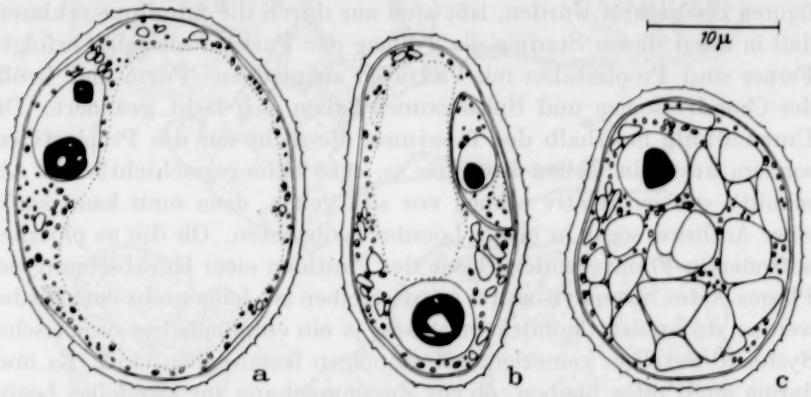



Abb. 14 a—c. *Impatiens glandulifera* ROYLE. Weitere Entwicklung des zweikernigen Pollenkorns. a u. b Verschieden geführte Schnitte durch das vacuolisierte Pollenkorn (Stadium 7). In Fig. a eine Keimfurche, in Fig. b die generative Zelle getroffen. In Fig. b ist die Stärkebildung etwas weiter fortgeschritten als in Fig. a. c Anschnitt eines stärkehaltigen Pollenkorns. Beachte die nicht stärkebildenden Proplastiden! Zeichenerklärung s. Abb. 12. Auf eine Darstellung der dünnen, um die Stärkekörner herumgelagerten Proplastidenhaut und die Exinemembranen wurde verzichtet. Die Grana in den Plastiden waren durch Stärke verdeckt. Regaud-Fixierung; Säurefuchsinfärbung nach ALTMANN

Pollenkorn begonnene Plastidenverkleinerung zum Abschluß gekommen, so daß alle Plasmapartikel in gleicher Größe und Form vorliegen (Abb. 14a und b). Zu diesem Zeitpunkt beginnt auch allmählich die Stärkebildung im Pollenkorn (unter Rückbildung der Vacuole), kenntlich an kleinen, unauffälligen Stärkekörnern. In späteren Stadien ist die vegetative Zelle mit großen, dreifach zusammengesetzten Stärkekörnern angefüllt.

Eine Tatsache dürfte für zukünftige genetische und entwicklungsgeschichtliche Betrachtungen bezüglich der Plastiden nicht bedeutungslos sein: An der Reservestärkebildung der vegetativen Zelle beteiligen sich nicht alle Proplastiden! Mit einiger Mühe lassen sich in den kurzen und schmalen Plasmapartien zwischen den großen Stärkekörnern Proplastiden von geringer Größe auffinden (Abb. 14c, Pollenkorn-Anschnitt).

Aus der Literatur sind uns nur zwei derartige Beobachtungen bekannt: Die erste, von KRUPKO (1927) stammende bezieht sich auf das Pollenkorn von *Gagea*

*lutea*. Während der Stärkebildung, die von ihm als 2. aktive Phase der Plastiden beschrieben wird, „il y a encore des plastides inactifs en forme de grands bâtonnets ou autres". — Die andere Beobachtung wurde von GUILLIERMOND (1933) an *Ricinus*-wurzeln gemacht. Nach ihm wird die Unterscheidung von Plastiden und Chondriosomen erschwert durch die Tatsache, daß die Stärkebildung niemals gleichmäßig in allen Plastiden erfolgt, und daß immer einige vorhanden sind, die „in Ruhe bleiben", während sich die anderen in Funktion befinden (S. 90).

Solche Befunde legen den Gedanken an spezialisierte Plastiden nahe. In diese Betrachtung deutet auch die alte Unterscheidung der Plastiden des Pollenkorns in Amylo- und Proteoplasten (z. B. GUILLIERMOND; PY).

In der generativen Zelle tritt keine Stärkebildung auf. (Gleiche Angaben von GUILLIERMOND, MANGENOT und PLANTEFOL 1933 sowie GUILLIERMOND 1924).

## C. Besprechung der Ergebnisse

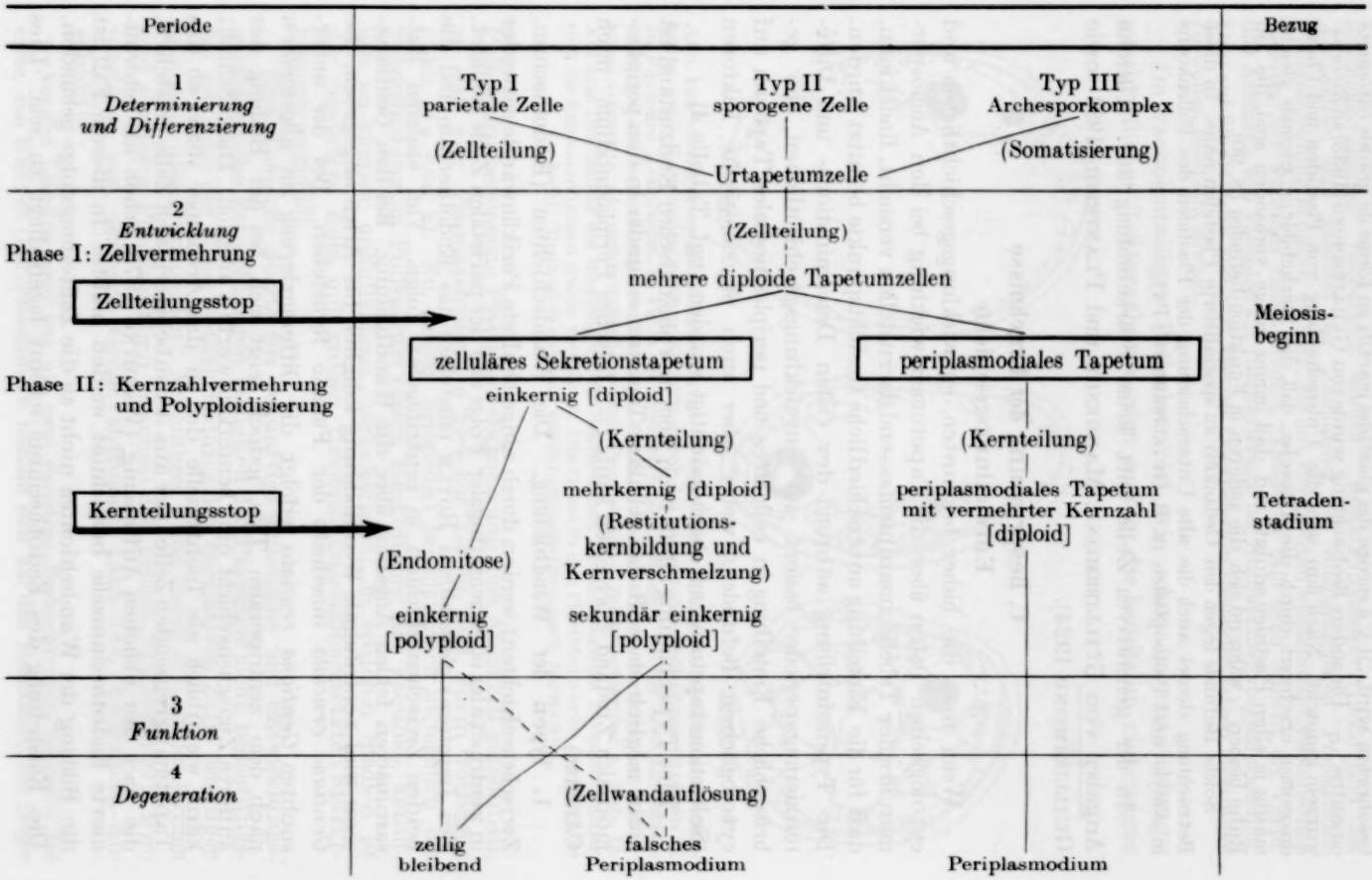
### Entwicklungsgeschichte

Wenn man die bisher bekannten, entwicklungsgeschichtlichen und cytologischen Daten über die Tapetumentwicklung bei den Angiospermen in einer Tabelle zusammenfassend darzustellen versucht, findet man, daß für die Einteilung unterschiedliche Gesichtspunkte benutzt wurden. Die Typeneinteilung während der ersten Determinations- und Differenzierungsperiode basiert auf entwicklungsgeschichtlichen, die gebräuchliche Einteilung in celluläres und periplasmodiales Tapetum auf cytologischen Befunden, wobei aber auch physiologische Faktoren (Sekretionstapetum) mit berücksichtigt wurden (vgl. Tabelle 4).

Eine Typenbildung allein nach dem morphologischen Endzustand ist nicht möglich, da z. B. das celluläre Tapetum sekundär in den periplasmodialen Zustand übergehen kann (= „falsches Periplasmodium" nach CARNIEL).

**1. Typen der Wandbildung.** Die Wandschichten (Endothecium, Zwischenschichten) werden durch eingeschaltete Periklinwände entweder in zentripetaler oder zentrifugaler Folge aus der parietalen Zelle gebildet. Bei *Impatiens glandulifera* ROYLE entstehen das Endothecium und die beiden Zwischenschichten in zentrifugaler Folge. Von anderen Balsaminaceen fehlen Angaben über die Wandbildung. Bei den Gentianaceen wird zentrifugale Wandbildung lediglich für Arten angegeben, die *Gentiana cruciata* innerhalb der Familie fernstehen. Bei der untersuchten *Gentiana cruciata* erfolgt die Differenzierung im allgemeinen nach dem zentripetalen Typ, jedoch zeigt sich bei der Bildung der äußeren Zwischenschicht eine bemerkenswerte Variation. Diese Schicht kann wie üblich als Tochterzelle der an das Archespor (bzw. an das Tapetum) grenzenden Zelle oder aus der subepidermalen Zelle entstehen, die nach der üblichen Auffassung (WARMING 1873) schon als determinierte Endotheciumzelle bezeichnet werden müßte. In diesem Fall ist die Bildung der Wandschichten nicht an die Zellteilungsfolge gebunden. Die Entstehung des Endotheciums scheint lagebedingt zu sein. Dies

Tabelle 4. *Die Tapetumentwicklung bei den Angiospermen*
(Verändert nach CARNIEL und MECHELKE)




( ) ablaufende Prozesse; [ ] Polyploidiegrad.

zeigt sich auch bei der Ausbildung der Faserschicht in den Bezirken, wo ihm keine Zwischenschichten anliegen, nämlich in der Septumregion zwischen den Loculi; letzteres gilt auch für *Impatiens*.

Wenn man annimmt, daß das Endothecium lagebedingt determiniert und differenziert wird, so kann als Bezug nur die Epidermis in Frage kommen. Damit läßt sich aber nicht die Entstehung in den Septen erklären. Man müßte als Hilfshypothese eine seitlich fortschreitende Induktionswirkung der schon determinierten äußeren Endotheciumschicht fordern.

Besonders bei *Gentiana* wird deutlich, daß auch die Zwischenschichten ihrer Lage gemäß entstehen, obwohl sie in diesem Fall aus Zellen unterschiedlicher Herkunft zusammengesetzt sind. Die Zwischenschichten sind stets die inneren, an das Archespor anschließenden Schichten, auf das sie ihrer Lage entsprechend bezogen werden müßten. Wenn man dieses Prinzip der lagegemäßen Differenzierung annehmen will, muß man zugeben, daß Endothecium und Zwischenschichten auf verschiedene Gewebe bezogen sind. — Die Möglichkeit eines anderen wirksamen Prinzips wird von Bütow (1955) erwogen: die Gradientenwirkung im Sinne der „entwicklungsgeschichtlichen Feldtheorie" Zimmermanns (z. B. 1954). Dabei fungiert der Komplex der Pollenmutterzellen sozusagen als Organisator, der die Determination der verschiedenen Gewebe in radiärer Richtung bewirkt (Endothecium, Zwischenschichten, Tapetum).

Betrachtet man dieses Prinzip kritisch, so braucht man über den entwicklungsgeschichtlichen Zustand des Organisationskomplexes (ob sekundäres Archespor oder Pollenmutterzellen) nicht zu streiten. Diese Frage beträfe ja nur den Zeitpunkt des Wirksamwerdens des Organisators und damit den Zeitpunkt der Determination. Wichtig ist allein, daß die Lehre von der Determination durch Periklinwände aufgehoben wird.

Das Organisatorprinzip hat den Vorteil, daß es eine gerichtete Determinierung zuläßt, während man bei einer lagegemäßen Determinierung unterschiedliche Bezugsgrößen wählen muß. Entscheidend ist, daß ein solches Organisatorprinzip erst wirksam wird, wenn eine bestimmte Anzahl von nun zu determinierenden Wandschichten gebildet worden ist und keine weiteren Zellteilungen mehr erfolgen. Wodurch die Schichten auf eine bestimmte Zahl (bei sehr unterschiedlichen Teilungsmodi in den Einzelzellen!) beschränkt werden, bleibt unbekannt. Eine zweite Schwierigkeit entsteht, wenn man das Organisatorprinzip auf die Schichten an der Innenseite des Loculus anwenden will. Hier fehlen die Endotheciumzellen; es müßte demnach eine graduell unterschiedliche Wirkung je nach Richtung angenommen werden.

Damit zeigt sich, daß das Organisatorprinzip wohl als Diskussionsgrundlage für Differenzierungsvorgänge benutzt werden kann, daß es aber die Differenzierung selbst nicht zu erklären vermag.

Bünning, Hunck und Lutz (1956) nehmen an, daß eine radiale Polarität für den Differenzierungsgradienten verantwortlich ist. Bartels

(1956) überträgt gewissermaßen diese Vorstellung in den Bereich der Cytologie. Er geht bei der Diskussion der Bildung einer zusätzlichen Epidermis auch auf die Differenzierung des Dermatogens ein. Er glaubt für die Zygote einen radiären Gradienten annehmen zu dürfen. Unter dieser Voraussetzung wären perikline Teilungen in bezug auf das Plasma inäquale Teilungen. Bedenklich erscheint, daß hier im Gegensatz zu der Vorstellung von MICHAELIS schon durch eine einzige Teilung eine Plasmonumkombination erreicht werden soll. Bedenklich ist auch, daß der Embryo als ein ruhendes System aufgefaßt wird, in dem die Organelle ihre Lage nicht verändern. Die Vorstellungen von BARTELS sind in dem Augenblick nicht anwendbar, wenn gleiche Gewebe auf verschiedenen Wegen entstehen (Zwischenschichten und Endothecium bei *Gentiana*).

**2. Typen der Tapetumentwicklung.** Es lassen sich 3 Typen der Tapetumentwicklung aufstellen: Als Typ I soll der am häufigsten vorkommende „Normaltyp" bezeichnet werden, bei dem das Tapetum als Abkömmling der parietalen Zelle entsteht. Interessant ist, daß dieser Typ auch bei den Gentianaceen und Balsaminaceen vorkommt, z. B. bei *Erythraea centaurium*, *Chlora perfoliata*, *Limnanthemum nymphoides*, *Menyanthes trifoliata* (GUERIN 1926), *Voyriella parviflora* (OEHLER 1927), *Limnanthemum cristatum*, *Enicostemma littorale* (SRINIVASAN 1941) und *Hydrocera triflora* (VENKATESWARLU und NARAYANA 1955).

Beim Typ II wird das Tapetum durch eine perikline Teilung aus der peripheren Lage der sekundären Archesporzellen gebildet. Mit anderen Worten: das Tapetum entsteht als randständiges Gewebe infolge eines an eine Teilung gebundenen Sterilisierungsprozesses innerhalb des sekundären Archespors.

Auf diese Weise entsteht auch das Tapetum der leptosporangiaten Farne, während sich der „Normaltyp" bei den eusporangiaten Farnen findet. Diese Art der Tapetumentstehung wird bereits von SACHS (1874) beschrieben („Mantelschicht") und von GOEBEL (1880) u. a. an *Selaginella* nochmals untersucht („Tapetum"). Unter den Angiospermen findet sich dieser Entwicklungstyp z. B. bei *Ranunculus septentrionalis*, *R. multifidus*, *R. abortivus* (COULTER 1898), *Zostera marina* (ROSENBERG 1901), *Butomus umbellatus* (HOLMGREN 1913), *Holoptelea integrifolia* (CAPOOR 1937), *Pulsatilla grandis* (BÜTOW 1955).

Bei Typ III ist die Tapetumbildung an keine Zellteilung gebunden. Sie erfolgt durch Sterilisation von Archesporzellen, wobei als Untertypen zu beschreiben wären

a) die Bildung einer peripheren Tapetumlage,

b) die willkürliche Sterilisation innerhalb des Archespors (Balkenbildung),

c) in Kombination der Typen a und b entsteht ein peripheres Tapetum und Tapetumbalken.

Als Beispiele für den Typ III a sind aus der Literatur bekannt: *Spiraea japonica*, *Sp. astilboides*, *Sp. planiflora*, *Sp. salicifolia* (WEBB 1902), *Sarracenia purpurea* (SHREVE 1906), *Heteranthera reniformis* (PALM 1920), *Leiphaimos spec.*, *Cotylan-*

*thera tenuis* (OEHLER 1927), *Garrya elliptica* (HALLOCK 1930), *Anthirrhinum majus* (MECHELKE 1952). Zu Typ IIIb gehören *Tmesipteris tannensis* (BOWER 1894), *Psilotum triquetrum* (BOWER 1894, HIRMER 1938). Den Entwicklungstyp IIIc zeigen außer *Gentiana cruciata* und *Impatiens glandulifera: Gentiana germanica, G. lutea, G. angustifolia, G. kochiana, G. punctata, G. pneumonanthe, G. asclepiadea, G. verna, G. dschungarica, G. tibetica, G. septemfida, Swertia perennis* (GUERIN 1924, 1925, 1926); für *Impatiens sultani* (OTTLEY 1918) wurde die Herkunft des Tapetums nicht festgestellt, Verf. vermutet jedoch, daß es wie die Zellen der Tapetumbalken durch Sterilisation sporogener Zellen entstanden ist. — Bei *Impatiens fulva* (CARROLL 1919) kann das sporogene Gewebe bis zu 50% sterilisiert werden. Die Balkenbildung soll jedoch erst nach Ausbildung des peripheren Tapetums erfolgen. — Für *Balsamina hortensis* (SOUZA VIOLANTE 1929) wird die Tapetumentstehung nicht beschrieben, die Darstellung läßt jedoch gleiche Verhältnisse wie bei *Impatiens glandulifera* vermuten. — Ferner sind an dieser Stelle zu nennen: *Lilaea subulata* (CAMPBELL 1898), *Isoetes lacustris* (BOWER 1894), *Elodea canadensis* (WYLIE 1904), *Ephedra trifurca* (LAND 1904), *Ulmus americana* (SHATTUCK 1905), *Gaura spec.* (BEER 1906), *Phoradendron flavescens, Ph. villosum* (BILLINGS 1932), äußeres Tapetum nach Typ II.

Es werden auch Kombinationen der Entstehungstypen I und III beschrieben (BOWER 1894: *Equisetum arvense* und *E. limosum*, SINGH 1952: *Dendrophthoe falcata*), wobei die periphere Tapetumschicht aus somatischem und die Balken aus sporogenem Gewebe entstehen. Diese Angaben wären zu überprüfen, da nur bei einer lückenlosen Reihe entwicklungsgeschichtlicher Stadien entschieden werden kann, ob die wandständige Tapetumlage aus sterilem Gewebe durch Zellteilung oder aus sporogenem Gewebe durch Sterilisation gebildet wird. — TIAGI (1952) vermutet, daß bei *Aeginetia indica* nur das Tapetum der Loculus-Innenseite sporogenen, das der Außenseite jedoch parietalen Ursprungs ist.

An dieser Stelle sei erwähnt, daß in Sonderfällen ein weiterer Sterilisierungsprozeß zu Verminderung des sporogenen Anteils in der Anthere führen kann. Uniloculäre Thecen können durch Bildung vertikaler Septen sekundär aufgeteilt werden. Normalerweise sind die Zellen, aus denen im Laufe des Antherenwachstums das Septum hervorgeht, schon im Stadium der primären Archesporzellen zu erkennen (s. auch *Gentiana* und *Impatiens*).

Es werden aber einige wenige Objekte genannt, bei denen diese Differenzierung erst zu einem späteren Zeitpunkt auftritt:

Bei *Tmesipteris tannensis* vermutet BOWER (1894), daß das Septumgewebe einen sterilen Teil des potentiellen Archespors darstellt. CALDWELL (1899) bemerkt, daß es bei *Lemna minor* zur Ausbildung steriler Platten kommt, die das Archespor einer Theca in zwei Gruppen teilen, und daß erst dann ein randständiges Tapetum gebildet wird, dessen Herkunft unsicher ist. Nach VENKATESH (1955) sollen auch die quadriloculären Antheren von *Najas palustris* und *Najas graminea* sekundär durch Vertikalsepten entstehen. Neuerdings beschreibt BÜTOW (1955) für *Pulsatilla grandis* die Aufteilung des Archesporbezirks durch verhältnismäßig verspätete Septenbildung. Die Anlage von zunächst zwei und später erst vier sporogenen Komplexen wird als „Anklang an das doppelt-dichotome Verzweigungssystem eines Sporangienstandes" gedeutet. Es wäre wünschenswert, daß das Problem der Septenbildung entwicklungsgeschichtlich unter Berücksichtigung der Bildung horizontaler Septen, wie sie z. B. bei den Mimosaceen, den Loranthaceen (Literatur bei SCHNARF 1931 und MAHESHWARI 1950) und der Gattung *Quamoclit* der Convolvulaceen (FEDORTSCHUK 1932) vorkommt, bearbeitet würde.

**3. Das Tapetum bei Gentianaceen und Balsaminaceen.** Sowohl bei *Gentiana cruciata* als auch bei *Impatiens glandulifera* wird ein Sekretionstapetum ausgebildet. Die karyologischen Veränderungen in diesem setzen zum gleichen Zeitpunkt, nämlich vor oder zu Beginn der Meiosis ein, finden jedoch ihren Abschluß in verschiedenen Phasen der Antherenentwicklung. Das Tapetum von *Gentiana* bleibt stets einkernig, es wird durch einen Endomitosecyclus tetraploid. Dieser Prozeß, der äußere und innere Tapetumzellen betrifft, findet innerhalb der Anthere erst im Tetradenstadium seine Beendigung. Die Tapetumzellen von *Impatiens* werden durch eine freie Kernteilung zweikernig. Dieser Zustand ist spätestens z. Zt. der Prophase der Meiosis erreicht.

GUERIN gibt für die von ihm untersuchten *Gentiana*-Arten ein Periplasmodium an, ebenso SCHNARF (1923) für *Gentiana carpathica*, WOYCICKI (1932, 1933, 1935, z. T. zitiert nach WUNDERLICH 1954) für *Gentiana asclepiadea*, *G. lutea*, *G. fetisowi* und PY (1932) für *Gentiana cruciata*. Diese Angaben wären nachzuprüfen, da die Wände der Tapetumzellen infolge ihrer geringen Dicke leicht übersehen werden. Bei der Degeneration des Gewebes sind nach Verschwinden des Zellinhaltes bei *Gentiana cruciata* gerade die Zellwände als Überreste zu beobachten.

Celluläres Tapetum wird beschrieben bei den Gentianaceen *Voyria coerulea*, *Voyriella parviflora*, *Leiphaimos spec.*, *Cotylanthera tenuis* (OEHLER 1927), *Swertia carolinensis* (MCCOY 1949), *Exacum pedunculatum* (VENKATESH 1955) und für die Balsaminaceen *Impatiens sultani* (OTTLEY 1918), vermutlich auch für *Balsamina hortensis* (SOUZA VIOLANTE 1929). — Für *Impatiens parviflora* und *Hydrocera triflora* wird von SCHÜRHOFF (1931), für *Hydrocera* auch von VENKATESWARLU und NARAYANA (1955) die sicherlich unrichtige Auffassung vertreten, daß die Tapetumzellen von außen her zwischen die Pollenmutterzellen einwandern. Nach SCHÜRHOFFs Darstellung muß man auf ein amöboid bewegliches Tapetum schließen.

Die Degeneration des Tapetums setzt bei den untersuchten Arten nach der ersten Pollenkornmitose ein. Es ist in Übereinstimmung mit MECHELKE (1952) möglich, den Entwicklungsgang des Tapetums von *Gentiana cruciata* und *Impatiens glandulifera* in 4 Phasen zu unterteilen:

1. Determinierungs- und Differenzierungsphase (Determination und Differenzierung aus dem sporogenen Gewebe),

2. Entwicklungsphase (Endomitose [*Gentiana*] bzw. freie Kernteilung [*Impatiens*]),

3. Funktionsphase (*Impatiens:* Kern- und Nucleolusvergrößerung),

4. Degenerationsphase.

Die Stadien 2—4 entsprechen den von CARNIEL (1952) aufgestellten Entwicklungsschnitten 1—3. Bei seinem Schema blieben jedoch die Determinationsmodi unberücksichtigt.

Über die Kernverhältnisse im Tapetum der beiden Familien liegen bisher folgende Angaben vor:

*a) Gentianaceen.* Stets einkerniges Tapetum: *Gentiana, Swertia* (GUERIN 1925); *Voyria* und *Voyriella* (OEHLER 1927). Tapetum einkernig: *Chlora* (GUERIN 1925); *Enicostemma littorale* (SRINIVASAN 1941); *Exacum pedunculatum* (VENKATESH 1955). Zwei-, drei- und vierkernig (mehr oder weniger fusionierend): *Erythraea, Cicendia.* Drei- und vierkernig (Kernfusionen): *Menyanthes* (GUERIN 1925), *Limnanthemum* (GUERIN 1925, SRINIVASAN 1941).

Da die zitierten Angaben aus nicht cytologisch orientierten Arbeiten stammen, läßt sich über den Polyploidiegrad der einkernigen Tapetumzellen keine Aussage machen.

*b) Balsaminaceen. Impatiens sultani:* zweikernig (OTTLEY 1918); später sollen bis zu 11 Kerne zu beobachten sein, was schon von SCHÜRHOFF (1931) in Frage gestellt wird. — *Impatiens parviflora* (SCHÜRHOFF 1931): die „eingedrungenen" Tapetumzellen sind einkernig, bei der Tetradentrennung befinden sich „beide Tapetumzellarten" im zweikernigen Zustand. *Hydrocera triflora:* während der Diakinese noch einkernige Tapetumzellen, bei Tetradenbildung zweikernig (SCHÜRHOFF 1931). Drei- bis Vierkernigkeit geben VENKATESWARLU und NARAYANA (1955) an. (Die Angabe scheint verdächtig.)

## *Cytologie*

**Größe der Plasmapartikel im Vergleich mit den Angaben in der Literatur.** Vergleicht man die bei *Impatiens glandulifera* gefundenen Meßwerte der Chondriosomen und Sphärosomen und der Proplastiden mit den Angaben der Literatur, so zeigt sich, daß sich beide Partikelgruppen größenordnungsmäßig in den Rahmen früherer Arbeiten einordnen. Auffällig ist nur die geringe Größe der Chondriosomen und Sphärosomen (maximal $0{,}9 \cdot 0{,}35\,\mu$; minimal $0{,}2 \cdot 0{,}17\,\mu$). Die bei *Impatiens* für die Proplastiden gefundenen Werte in den Pollenmutterzellen (Länge: 1,2—0,3 $\mu$; Breite: 1,1—0,13 $\mu$) entsprechen größenordnungsmäßig den Plastiden in den Urmeristemzellen von *Chlorophytum comosum* (STRUGGER 1953), die der Tapetumzellen mit der Länge von 5,7 bis 0,5 $\mu$ und der Breite von 1,2—0,3 $\mu$ denen der postmeristematischen Parenchymzellen von *Chlorophytum* (STRUGGER 1953) und den Mesophyllzellen von *Agapanthus* (STRUGGER 1954).

Die bei *Impatiens* in allen ausgewerteten Entwicklungsstadien identifizierbaren Primärgrana variierten in ihrem Durchmesser von 0,2 bis 0,65 $\mu$ (Mittel um 0,4 $\mu$). Die größten Grana (0,65—0,43 $\mu$) traten in den Proplastiden der Tapetumzellen kurz vor der Degeneration und in der vegetativen Zelle des jungen zweikernigen Pollenkorns (0,56—0,43 $\mu$), die kleinsten (0,39—0,2 $\mu$) in der generativen Zelle der zweikernigen Pollenkornstadien auf. — Es zeigt sich, daß die Ergebnisse am besten mit denen an *Agapanthus* (STRUGGER 1954) vergleichbar sind (0,3—0,7 $\mu$). Abgesehen von einer zunächst nicht erfaßbaren Beeinflussung durch physiologische Faktoren, scheint nach den Angaben STRUGGERS (1953) eine Granumvergrößerung mit fortschreitender Differenzierung und Spezialisierung der Zellen zu erfolgen.

Für die Genetik, insbesondere die Plasmavererbung, ist die Frage nach dem Vorkommen und dem zahlenmäßigen Verhältnis der Proplastiden und Chondriosomen und Sphärosomen in der generativen Zelle und den Spermazellen von entscheidender Bedeutung (vgl. MICHAELIS 1955a, b). Das gemeinsame Auftreten von Plastiden und Chondriosomen in den genannten Zellen wurde bisher selten beschrieben; das liegt z. T. an der geringen Größe der Partikel, z. T. wohl auch an dem Vorherrschen der Transformationstheorie, die die Beobachtungen beeinflußt haben dürfte. —

Im „Traité de Cytologie végétale" (1933) findet sich eine Zeichnung der generativen Zelle von *Lilium candidum* (nach PY) mit Plastiden und Chondriosomen. — Bei den Liliaceen (GUILLIERMOND 1924) unterscheiden sich die Plastiden auch in der generativen Zelle „des autres mitochondries par leurs dimensions plus élévées, mais ils n'élaborent pas d'amidon". — Plastiden in der generativen Zelle wurden auch von KRUPKO (1927) und PY (1932) festgestellt. — Die Befunde von RUHLAND und WETZEL (1924), die in der generativen Zelle von *Lupinus luteus* sogar Chlorophyll nachwiesen, dürfen nicht verallgemeinert werden. Die mit $AgNO_3$-Behandlung dargestellten Granula liegen in der gleichen Größenordnung wie die Chondriosomen und Sphärosomen von *Impatiens* (0,2—0,3 $\mu$ Durchmesser). Die Größe der in den Abbildungen dargestellten Partikel stimmt jedoch nicht mit diesen Werten überein, was auf einer falschen Angabe des Vergrößerungsmaßstabes beruhen kann.

Die Vergrößerung der Proplastiden der Pollenmutterzellen während der Meiosis in Zusammenhang mit der Bildung der Kohlehydratpartikel wurde bereits besprochen. In Verbindung damit gewinnt die Untersuchung von HIRAOKA (1952) Bedeutung, in der die Saugkraft von Pollenmutterzellen im Verlauf der Meiosis geprüft wurde. Es zeigte sich, daß beim Übergang vom Leptotän zum Zygotän eine Zunahme der Saugkraft auftritt. Gleichzeitig steigt der Gehalt an reduzierenden Zuckern und $AgNO_3$-reduzierenden Granula. (Dieser Befund bestätigt die Vermehrung der Plasmapartikel in den Pollenmutterzellen von *Impatiens glandulifera* bis zu diesem Zeitpunkt.) Vom Pachytän bis zur Diakinese vermindert sich jedoch die Saugkraft der Zellen. Der Verf. kommt nach Berücksichtigung aller möglichen Außeneinflüsse zu dem Schluß, daß diese Verringerung durch Veränderungen innerhalb der Pollenmutterzellen bedingt sein muß. Vielleicht ist die bei *Impatiens* beobachtete Kohlehydratbildung während der Meiosis weit verbreitet, und der Abfall der Saugkraft ist auf die Beseitigung osmotisch wirksamer Stoffe (Zucker) durch diesen Prozeß zurückführbar.

Neben der entwicklungsgeschichtlichen Zielsetzung, der Aufklärung der Entstehung des Balkentapetums, hat die vorliegende Arbeit den Zweck, die morphologischen, für die Beurteilung des Differenzierungsproblems wichtigen Daten zusammenzufassen. In einer folgenden Untersuchung wird unter Berücksichtigung der hier mitgeteilten Ergebnisse diskutiert werden, wie weit eine inäquale Verteilung von Chondriosomen und Proplastiden bei Differenzierungsprozessen von Bedeutung sein kann.

Vorliegende Arbeit stellt einen Auszug aus der Dissertation der Verfasserin dar.

## Zusammenfassung

Die Entstehung des Balkentapetums bei *Gentiana cruciata* und *Impatiens glandulifera* wird beschrieben und in Beziehung zu den übrigen Tapetumtypen gesetzt. Bei *Gentiana* verläuft die Wandschichtenbildung meist zentripetal, oft (in 30% aller untersuchten Fälle) auch zentrifugal. Die Entstehung der Zwischenschichten schreitet an der Loculus-Innenseite von einem Placentoid aus peripher fort. Bei *Impatiens* entstehen das Endothecium und die beiden Zwischenschichten stets in zentrifugaler Folge. Das Tapetum ist bei beiden untersuchten Arten sporogenen Ursprungs und wird in Form einer peripheren Lage und von 1—2 Zellen breiten Balken gebildet, die den Loculus in unterschiedlich große Kammern aufteilen. Pollenmutter- und Tapetumzellen unterscheiden sich cytologisch und karyologisch (Kern- und Nucleolusvolumina und Chromozentrengröße). Kurz vor oder zu Beginn der Meiosis beginnen bei beiden Arten die karyologischen Veränderungen im Tapetum: seine Zellen werden bei *Gentiana* durch Endomitose tetraploid, bei *Impatiens* durch freie Kernteilung zweikernig. Entgegen früheren Literaturangaben bleiben sie bis zur Degeneration zellig. Beide Arten besitzen also ein celluläres Sekretionstapetum. — Der Nachweis der Endomitose im Tapetum von *Gentiana cruciata* erfolgte durch Strukturanalyse der Kerne (Endo-Inter- und Endo-Prophase) und den Nachweis der periodischen Wiederkehr dieser Strukturen in verschiedenen Kern-Größenklassen.


## Literatur


Bartels, F.: Abnorme Epidermisausbildung bei einer Plasmonabänderung von Epilobium hirsutum als Beitrag zum Determinationsproblem. Ber. dtsch. bot. Ges. **69**, 375—380 (1956). — Beer, R.: On the development of the pollen grain and anther of some Onagraceae. Beih. bot. Zbl. **19**, 286—313 (1906). — Billings, F. H.: Microsporogenesis in Phoradendron. Ann. of Bot. **46**, 976—992 (1932). — Bowen, R. H.: The distribution of the plastidome during mitosis in plerome-cells of Ricinus. Cellule **39**, 123—156 (1929). — Bower, F. O.: Studies in the morphology of spore-producing members. Equisetineae and Lycopodineae. Philosophic. Trans. Roy. Soc. Lond. Ser. B, **185**, 473—572 (1894). — Bünning, E., G. Hunck u. H. Lutz: Über die Rolle longitudinaler und radialer Polaritätsgradienten bei der Gewebedifferenzierung von Pflanzen. Protoplasma (Wien) **46**, 108—115 (1956). — Bütow, R.: Die Entwicklung der Pulsatilla-Anthere. Z. Bot. **43**, 423—449 (1955). — Caldwell, O. W.: On the life history of Lemna minor. Bot. Gaz. **27**, 37—66 (1899). — Campbell, D. H.: The development of the flower and embryo in Lilaea subulata H. B. K. Ann. of Bot. **12**, 1—28 (1898). — Capoor, S. W.: The life history of Holoptelea integrifolia Planch. Beih. bot. Zbl. Abt. A **57**, 233—249 (1937). — Carniel, K.: Das Verhalten der Kerne im Tapetum mit besonderer Berücksichtigung von Endomitosen und sogenannten Endomitosen. Österr. bot. Z. **99**, 318—362 (1952). — Endomitosen im zellulär-einkernigen Tapetum. (Kurze Mitteilung.) Österr. bot. Z. **101**, 435—436 (1954). — Carrol, F. B.: The development of the chasmogamous and the cleistogamous flowers of Impatiens fulva. Contr. Bot. Labor. Univ. Pennsylvania **4**, 144—183 (1919). — Chadefaud, M.: Le pollen des Impatiences et la théorie de Wodehouse. Bull. Soc. bot. France **99**,

182—183 (1952). — COULTER, J. M.: Contribution to the life history of Ranunculus. Bot. Gaz. **25**, 73—88 (1898). — CZEIKA, G.: Strukturveränderungen endopolyploider Ruhekerne im Zusammenhang mit wechselnder Bündelung der Tochterchromosomen und karyologisch-anatomische Untersuchungen an Sukkulenten. Österr. bot. Z. **103**, 536—566 (1957). — DANGEARD, P. A.: Sur la structure de la cellule chez les Iris. C. r. Acad. Sci. Paris **175**, 7—12 (1922). — DARLINGTON, C. D., and L. F. LA COUR: The Handling of Chromosomes. London: George Allen and Unwin 1947. — DOLEŽAL, R., u. E. TSCHERMAK-WOESS: Verhalten von Eu- und Heterochromatin und interphasisches Kernwachstum bei Rhoeo discolor; Vergleich von Mitose und Endomitose. Österr. bot. Z. **102**, 158—185 (1955). — DRAWERT, H.: Vitalfärbung der Plastiden von Allium cepa mit Coelestinblau. Ber. dtsch. bot. Ges. **67**, 33—42 (1954). — ERDTMAN, G.: Pollenmorphology and plant taxonomy. Angiosperms. (An introduction to palynology. I.) Waltham, Mass.: Chronica Botanica Co. 1952. — FASSE-FRANZISKET, U.: Die Teilung der Proplastiden und Chloroplasten bei Agapanthus umbellatus L'HERIT. Protoplasma (Wien) **45**, 194—227 (1955). — FEDORTSCHUK, W.: Entwicklung und Bau des männlichen Gametophyten bei den Arten der Convolvulaceen-Gattung Quamoclit. Planta (Berl.) **16**, 554—574 (1932). — GEITLER, L.: Endomitose und endomitotische Polyploidisierung. Protoplasmatologia C **6**, 1—89 (1953). — Morphologie und Entwicklungsgeschichte der Zelle. Fortschr. Bot. **15**, 1—11 (1954). — Normale und pathologische Anatomie der Zelle. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. 1, S. 123—167. 1955. — GOEBEL, K.: Beiträge zur vergleichenden Entwicklungsgeschichte der Sporangien. Bot. Ztg. **38**, 545—552, 561—571 (1880). — GRAVE, G.: Studien über die Entwicklung der Chloroplasten bei Agapanthus umbellatus. Protoplasma (Wien) **44**, 273—298 (1955). — GUERIN, P.: Le développement de l'anthère et du pollen chez les Gentianes. C. r. Acad. Sci. Paris **179**, 1620—1622 (1924). — L'anthère des Gentianacées. Développement du sac pollinique. C. r. Acad. Sci. Paris **180**, 852—854 (1925). — Le développement de l'anthère chez les Gentianacées. Bull. Soc. bot. France **73**, 5—18 (1926). — GUILLIERMOND, A.: Recherches sur l'évolution du chondriome pendant le développement du sac embryonnaire et des cellules mères des grains de pollen dans les Liliacées et sur la signification des formations ergastoplasmiques. Ann. des Sci. natur. Bot., Sér. X, **6**, 1—52 (1924). — GUILLIERMOND, A., G. MANGENOT et L. PLANTEFOL: Traité de Cytologie végétale. Paris 1933. — HALLOCK, F. A.: The relationship of Garrya. The development of the flowers and seeds of Garrya and its bearing of the phylogenetic position of the genus. Ann. of Bot. **44**, 771—812 (1930). — HIRAOKA, T.: Observational and experimental studies of meiosis with special reference to the bouquet stage. IX. Suction force and permeability to urea of spore mother cells undergoing meiosis. Cytologia (Tokyo) **17**, 6—13 (1952). — HIRMER, M.: Psilotinae. Articulatae. In F. VERDOORN, Manual of pteridology, S. 506—510 u. 511 bis 521. The Hague; M. Nijhoff 1938. — HOLMGREN, J.: Zur Entwicklungsgeschichte von Butomus umbellatus L. Sv. bot. Tidskr. **7**, 58—77 (1913). — HYDE, H. A.: Oncus, a new term in pollen morphology. New Phytologist **54**, 225—256 (1955). — KAJA, H.: Untersuchungen über die Kontinuität der Granastruktur in den Plastiden der Moose. Ber. dtsch. bot. Ges. **67**, 93—107 (1954). — KHOSHOO, T. N.: Cytology of Impatiens. Current Sci. **24**, 423—424 (1955). — Chromosomes from herbarium sheets of Impatiens. Stain Technol. **31**, 31—33 (1956). — KRUPKO, ST.: Les plastides et les chondriosomes pendant la gonogenèse dans le Gagea lutea L. Acta Soc. Bot. Polon. **4**, 77—86 (1927). — LAND, W. J. G.: Spermatogenesis and oogenesis in Ephedra trifurca. Bot. Gaz. **38**, 1—18 (1904). — LINNERT, G.: Die Struktur der Pachytänchromosomen in Euchromatin und Heterochromatin und ihre Auswirkung auf die Chiasmenbildung bei Salvia-Arten. Chromosoma **5**, 90—128 (1955). — LUDWIG, W.: Weitere Mitteilungen über Impatiens glandulifera ROYLE (= I. roylei WALP). Hess. florist. Briefe **5** (58) (1956). —

MAHESHWARI, P.: An introduction to the embryology of angiosperms. New York-Toronto-London 1950. — MCCOY, R. W.: On the embryology of Swertia carolinensis. Bull. Torrey Bot. Club **76**, 430—439 (1949). — MECHELKE, F.: Die Entstehung der polyploiden Zellkerne des Antherentapetums bei Antirrhinum majus L. Chromosoma **5**, 246—295 (1952). — MICHAELIS, P.: Über Gesetzmäßigkeiten der Plasmon-Umkombination und über eine Methode zur Trennung einer Plastiden-, Chondriosomen, resp. Sphärosomen-(Mikrosomen)- und einer Zytoplasmavererbung. Vorläufige Mitteilung. Cytologia (Tokyo) **20**, 315—338 (1955). — NOACK, K.: Untersuchungen über die Individualität der Plastiden bei Phanerogamen. Z. Bot. **13**, 1—35 (1921). — OEHLER, E.: Entwicklungsgeschichtlich-zytologische Untersuchungen an einigen saprophytischen Gentianaceen. Planta (Berl.) **3**, 641 bis 733 (1927). — OEHLKERS, F., u. P. EBERLE: Spiralen und Chromomeren in der Meiosis von Bellevalia romana. Chromosoma **8**, 351—368 (1957). — OTTLEY, A. M.: A contribution to the life history of Impatiens sultani. Bot. Gaz. **66**, 289 bis 317 (1918). — PALM, B. J.: Preliminary notes on pollen development in tropical monocotyledons. Sv. bot. Tidskr. **14**, 261—266 (1920). — PERNER, E. S., u. O. PFEFFERKORN: Pflanzliche Chondriosomen im Licht- und Elektronenmikroskop unter Berücksichtigung ihrer morphologischen Veränderung bei der Isolierung. Flora (Jena) **140**, 98—129 (1953). — PFEIFFER, H. H.: Polarisationsmikroskopische Messungen an Mikrosporenmutterzellen von Tradescantia paludosa. Protoplasma (Wien) **39**, 277—282 (1950). — PY, G.: Recherches sur l'assise nourricière de microspores et en particulier sur le comportement des constituants morphologiques du protoplasme. Rev. gén. Bot. **44**, 316—413, 450—462, 484—512 (1932). — RAGHAVAN, T. S., K. R. VENKATASUBBAN and H. D. WULFF: Division of the generative cell in Impatiens balsamina L. Cytologia (Tokyo) **9**, 389—392 (1939). — RESCH, A.: Untersuchungen über Kerndifferenzierung in peripheren Zellschichten der Sproßachse einiger Blütenpflanzen. Chromosoma **5**, 296—316 (1952). — ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik. München: Leibniz 1948. — ROSENBERG, O.: Über die Embryologie von Zostera marina L. Bihang Till K. Svenska Vet.-Akad. Handlinger **27** (III), 3—24 (1901). — ROUSI, A.: Cytotaxonomy and reproduction in the apomictic Ranunculus auricomus group. Ann. bot. Soc. zool.-fenn. „Vanamo" **29**, Nr 2, 1—64 (1956). — RUHLAND, W., u. K. WETZEL: Der Nachweis von Chloroplasten in den generativen Zellen von Pollenschläuchen. Ber. dtsch. bot. Ges. **42**, 3—14 (1924). — SACHS, J.: Lehrbuch der Botanik. Leipzig 1874. — SCARASCIA, G.: Sviluppo del tappeto dell'antera in Nicotiana tabacum L. var. BRIGHT. Caryologia (Pisa) **5**, 25—42 (1952). — SCHNARF, K.: Über das Verhalten des Antherentapetums einiger Pflanzen. Österr. bot. Z. **72**, 242—245 (1923). — Vergleichende Embryologie der Angiospermen. Berlin: Gebrüder Bornträger 1931. — Vergleichende Cytologie des Geschlechtsapparates der Kormophyten. Berlin: Gebrüder Bornträger 1941. — SCHÜRHOFF, P. N.: Die Haploidgeneration der Balsaminaceen und ihre Verwertung für die Systematik. Englers bot. Jb. **64**, 324—356 (1931). — SHATTUCK, C. H.: A morphological study of Ulmus americana. Bot. Gaz. **40**, 209—223 (1905). — SHREVE, F.: The development and anatomy of Sarracenia purpurea. Bot. Gaz. **42**, 107—126 (1906). — SINGH, B.: A contribution to the floral morphology of Dendrophthoe falcata (L. f.) ETTINGSH. J. Linnean Soc. Bot. **53**, 449—472 (1952). — SOROKIN, H. P.: Mitochondria and spherosomes in the living epidermal cell. Amer. J. Bot. **42**, 225—231 (1955). — SOUZA VIOLANTE, J. M.: La parasyndèse de Balsamina hortensis et Campanula persicifolia. Cellule **39**, 233—266 (1929). — SRINIVASAN, A. R.: Cyto-morphological features of Limnanthemum cristatum GRISEB and Enicostemma littorale BLUME. Proc. Indian Acad. Sci., Sect. B, **14**, 529—542 (1941). — STEFFEN, K.: Zur Kenntnis des Befruchtungsvorganges bei Impatiens glanduligera LINDL. Cytologische Studien am Embryosack der Balsamineen. Planta (Berl.) **39**, 175—244 (1951). — Submikroskopische Struktur der Pollenkorn-Membran. Z. Bot. **43**, 346—351 (1955a). —

Kern- und Nucleolenwachstum bei endomitotischer Polyploidisierung. (Ein Beitrag zur karyologischen Anatomie von Pedicularis palustris L.). Planta (Berl.) **45**, 379—394 (1955b). — Endomitosen im Endosperm von Pedicularis palustris. Planta (Berl.) **47**, 625—652 (1956). — Steil, W. N.: Some evidence for the interaction of tapetal and sporogenous cells in certain vascular plants. Bot. Gaz. **111**, 300—306 (1949/50). — Strugger, S.: Über die Struktur der Proplastiden. Ber. dtsch. bot. Ges. **66**, 439—453 (1953). — Die Proplastiden in den jungen Blättern von Agapanthus umbellatus L'Herit. Protoplasma (Wien) **43**, 120—173 (1954). — Tiagi, B.: Studies in the family Orobanchacea. II. A contribution to the embryology of Aeginetia indica Linn. Bull. Torrey Bot. Club **79**, 63—78 (1952). — Tschermak-Woess, E.: Über die Phasen der Endomitose, Herkunft und Verhalten der „nuclealen Körper" und Beobachtungen zur karyologischen Anatomie von Sauromatum guttatum. Planta (Berl.) **44**, 509—531 (1954). — Karyologische Pflanzenanatomie. Ein kritischer Überblick. Protoplasma (Wien) **46**, 798—834 (1956). — Tschermak-Woess, E., u. G. Hasitschka: Veränderungen der Kernstruktur während der Endomitose, rhythmisches Kernwachstum und verschiedenes Heterochromatin bei Angiospermen. Chromosoma **5**, 574—614 (1953). — Venkatesh, C. S.: Structure and special modes of dehiscence of the anther in angiospermes. Diss. Delhi 1955. — Venkateswarlu, J., and L. L. Narayana: Life-history of Hydrocery triflora. Current Sci. **24**, 52—53 (1955). — Wagner, N.: Sur les chondriosomes et les plastides pendant la formation du pollen chez Veratrum album L. Mem. Soc. Nat. Kiew **25** (1915). (Zit. nach Guilliermond 1924. —) Evolution du chondriome pendant la formation des grains de pollen chez les Angiosperms. Biol. generalis (Wien) **3**, 15—66 (1927). — Warming, E.: Untersuchungen über pollenbildende Phyllome und Kaulome. Bot. Abh. **2**, 1—90 (1873). — Webb, J. E.: A morphological study of the flower and embryo of Spiraea. Bot. Gaz. **33**, 451—460 (1902). — Woycicki, Z.: Über die simultane Tetradenteilung. Acta Soc. Bot. Polon. **9**, 457—472 (1932). — Quelques détails du développement des anthères et du pollen chez certains réprésentants du genre Gentiana. II. Gentiana Fetisowi Rgl. et Winkler. [Polnisch mit franz. Zus.fass.] Acta Soc. Bot. Polon. **10**, 1—24 (1933). — Zur Entwicklungsgeschichte der Antheren und des Pollens bei einigen Repräsentanten der Gattung Gentiana. III. Gentiana lutea L. Acta Soc. Bot. Polon. **12**, 207—226 (1935). — Wunderlich, R.: Über das Antherentapetum mit besonderer Berücksichtigung seiner Kernzahl. Österr. bot. Z. **101**, 1—63 (1954). — Wylie, R. B.: The morphology of Elodea canadensis. Bot. Gaz. **37**, 1—22 (1904). — Zimmermann, W.: Das Homologieproblem erläutert am Beispiel der Stelärtheorie. Ber. dtsch. bot. Ges. **67**, 311—317 (1954).

Prof. Dr. Kurt Steffen,
Pharmakognostisches Institut der Technischen Hochschule Braunschweig
und Dr. Waldtraut Landmann, Institut für Entwicklungsphysiologie,
Köln-Lindenthal, Gyrhofstr. 17

## Aufnahmebedingungen

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Für die Rechtschreibung ist die „Wissenschaftliche Rechtschreibung nach JANSEN" maßgebend, mit der die Schreibung der Termini im „Handwörterbuch der Naturwissenschaften" (Jena 1931—1934) im wesentlichen übereinstimmt. Wenn nötig, wird die Angleichung durch die Herausgeber bzw. durch die Druckerei vorgenommen.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photographien. Einzelfiguren einer Abbildung sind, falls es sich um Vorlagen für Strichätzungen handelt, wenn möglich so zusammenzustellen, daß sie in *einem* Klischee bei gleicher Verkleinerung reproduziert werden können. Buchstaben u. a. sind mit Bleistift beizufügen.

Die Texte zu den Abbildungen sind auf eigenem Blatt gesammelt beizugeben.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse (höchstens 1 Seite) anzufügen, die in Deutsch oder Englisch oder Französisch abgefaßt sein kann.

Zu den Literaturverzeichnissen: Bei Zeitschriftenartikeln sollen der Titel sowie erste und letzte Seite angegeben werden. In den Titeln von Büchern aller Sprachen sollen, zur Kennzeichnung gegenüber Artikeln in Zeitschriften, Substantiva wie Adjektiva groß, dagegen in den Abkürzungen von Zeitschriftentiteln die Substantiva groß und die Adjektiva klein geschrieben werden (z. B. Cell Res., aber cell. Physiol.).


**Methoden zur Bestimmung pflanzlicher Wuchsstoffe**

Von **Hans Linser**, Dr. phil., Privatdozent an der Technischen Hochschule und an der Hochschule für Bodenkultur, Wien; Leiter des Biologischen Laboratoriums der Österr. Stickstoffwerke Aktiengesellschaft, Linz, und **Oswald Kiermayer**, Dr. phil., Biologisches Laboratorium der Österr. Stickstoffwerke Aktiengesellschaft, Linz. Mit 98 Textabbildungen. VII, 181 Seiten Gr.-8°. 1957. Ganzleinen DM 33.—

Inhaltsübersicht: **Methoden zur Gewinnung von Wuchsstoffen aus der Pflanze.** Abfangmethode. Extraktionsmethoden. — **Methoden zur Trennung von Wuchs- und Hemmstoffen aus pflanzlichen Extrakten.** Trennung auf Grund verschiedener Löslichkeit, durch Wuchsstoff-Inaktivierung und durch Diffusion. Säulenchromatographische, papierchromatographische und papierelektrophoretische Methoden. Elektrodialytisches (kataphoretisches) Verfahren. Verteilungsmethode (Counter-Current-Distribution). Sublimations-Methode. — **Chemische Methoden zur Bestimmung von Wuchsstoffen.** Colorimetrische, fluorometrische und histochemische Methoden. Photoprint-Verfahren. — **Physiologische Testmethoden zum qualitativen Nachweis bzw. zur quantitativen Bestimmung von Wuchsstoffen.** Methoden mit Krümmungsmessung. Methoden mit Längenwachstumsmessung. Wurzelwachstums-Teste. Verschiedene andere Testverfahren. — **Methode zur Molekulargewichtsbestimmung von Wuchsstoffen.** — **Verwendung von Radioisotopen in der Wuchsstofforschung.** — Literaturverzeichnis. — Namen- und Sachverzeichnis.

**SPRINGER-VERLAG / WIEN**

# Handbuch der Pflanzenphysiologie
# Encyclopedia of Plant Physiology

Herausgegeben von **W. Ruhland**, Unterdeufstetten, in Gemeinschaft mit E. Ashby, Belfast; J. Bonner, Pasadena; M. Geiger-Huber, Basel; W. O. James, Oxford; A. Lang, Los Angeles; D. Müller; Kopenhagen; M. G. Stålfelt, Stockholm.
In 18 Bänden.

*Anfang 1958 wird erscheinen:*

8. Band:

## Der Stickstoffumsatz
## Nitrogen Metabolism

Bearbeitet von E. K. Allen, O. N. Allen, I. Böttger, T. Caspersson, G. Dillemann, H. Engel, H. Fischer, M. Guggenheim, P. Haas, F. Haurowitz, W. D. Loomis, E. Manshard, H. S. McKee, K. McQuillen, W. Mevius, O. Moritz, K. Mothes, N. Nielsen, N. Rautanen, A. Romeike, F. Scheffer, K. Schmalfuß, G. Schramm, H.-B. Schröter, D. E. G. Sheat, D. Spencer, H. E. Street, P. K. Stumpf, K. Täufel, M. Thomas, E. Waldschmidt-Leitz, S. G. Waley, P. W. Wilson, E. W. Yemm. Redigiert von **K. Mothes.** Mit 50 Abbildungen. Etwa 1320 Seiten Gr.-8°. 1958.

**Vorbestellpreis gültig bis zum Erscheinen Ganzleinen DM 228.80**

Endgültiger Ladenpreis nach Erscheinen Ganzleinen DM 286.—

Bei Verpflichtung zur Abnahme des Gesamtwerkes gilt der Vorbestellpreis auch nach Erscheinen des Bandes weiter als Subskriptionspreis, jedoch ist jeder Band zum Ladenpreis einzeln käuflich.

Inhaltsübersicht: **I. Einführung und Übersicht. — II. Erwerb und Assimilation des Stickstoffs.** Übersicht. Die Bindung freien Stickstoffs. Der gebundene Stickstoff. Die Assimilation des gebundenen Stickstoffs. **III. Die Pflanzeneiweiße und Peptide.** Pflanzliche Eiweißkörper. The plant proteins and peptides and their localization in cells and tissues. Protein symplexes (Conjugated proteins). Special peptides. Die Serologie der pflanzlichen Eiweißkörper. Die ernährungsphysiologische Bedeutung der Eiweißpflanzen und Pflanzeneiweiße. — **IV. Der Eiweißumsatz.** Enzyme des Eiweißumsatzes. Biochemical mechanisms in the synthesis and breakdown of proteins. Die identische Reproduktion der Proteine. Der Eiweißwandel im Zellkern. Der Eiweißumsatz in höherenPflanzen, auch Speicherung und Mobilisierung, die Translokation der Eiweiße einschließlich Rückwanderung. Transport von organisch gebundenem Stickstoff. — **V. The degradation of amino-acids. — VI. Ammoniakentgiftung und Aminogruppenvorrat. — VII. Der Nucleinstoffwechsel.** Stoffwechsel der Purine und Pyrimidine. Stoffwechsel der Nucleinsäuren. — **VIII. Synthese und Stoffwechsel weiterer Stickstoffverbindungen.** Ringschluß mit N und Methylierung am N. Die biogenen Amine in der Pflanzenwelt. Die Alkaloide. Composés cyanogénétiques. Melanin. — **IX. Die Stickstoffentbindung. — X. Nitrifikation. — XI. Die geochemische Bedeutung des Stickstoffs unter besonderer Berücksichtigung der landwirtschaftlichen Produktion und der Dünger.** — Jeder Beitrag enthält ein Literaturverzeichnis. — Namenverzeichnis. — Author Index. — Sachverzeichnis (Deutsch-Englisch). Subject Index (English—German).

**SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG**


Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg
Printed in Germany